

Frequenzanalyse und Charakterisierung Antigen-spezifischer T-Zellen bei Melanompatienten unter Immuntherapie

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Gunda Herberth

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. H. Görisch

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. R. Lauster

Prof. Dr. med. W. Sterry

Prof. Dr. med. H-D. Volk

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 12.02.2003

Berlin 2003

D 83

Diese Arbeit wurde selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst. Für die praktischen Arbeiten wurden nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet.

Diese Arbeit wurde nach der reformierten Rechtschreibung verfasst.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. W. Sterry und Dr. U. Trefzer für die Überlassung des Themas und das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. U. Trefzer bedanke ich mich für die Betreuung im Labor und für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, die eine sehr gute Verknüpfung zwischen Klinik und Labor ermöglichte.

Prof. P. Walden danke ich für die fachliche Beratung und seine stete Bereitschaft die Ergebnisse kritisch zu diskutieren.

Ganz besonders möchte ich mich bei Fr. Dr. Sparbier für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten tetrameren MHC-Moleküle bedanken. Herzlichen Dank auch für die Durchsicht des Manuskripts!

Bei Frau Karin Adrian und Frau Petra Siegel möchte ich mich für Ihre große Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung bedanken. Meinen Kollegen Frau Yingwen Chen, Frau Christina Friedrich, Frau Christin Pelzer, Herrn Rodion Demine, Herrn Claus Zabel, Herrn Sascha Hin, Herrn Tumenjargal Sherev und Herrn Thomas Linnemann danke ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Bei allen nicht namentlich genannten Kollegen der Dermatologischen Klinik der Charité bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Sascha Rutz danke ich ganz herzlich für die stetige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und den starken Rückhalt.

1. Einleitung	8
1.1 Das maligne Melanom	8
1.2 Die anti-Tumor Immunantwort	9
1.2.1 Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten	9
1.2.2 Effektorfunktion zytotoxischer T-Lymphozyten	13
1.3 Tumorantigene	14
1.3.1 Melanom-assoziierte Antigene	15
1.3.1.1 Tumor-assoziierte Tumor/Testis-Antigene	15
1.3.1.2 Melanozytäre Differenzierungs-Antigene	17
1.3.1.3 Mutierte oder aberrant exprimierte Antigene	19
1.4 Tumor-escape Mechanismen beim malignen Melanom	20
1.5 Immuntherapien beim malignen Melanom	24
1.6 Immunmonitoring	27
1.6.1 Limiting Dilution Analyse (LDA)	27
1.6.2 ELISPOT	27
1.6.3 ⁵¹ Cr-Freisetzungsversuch	28
1.6.4 Tetramere MHC-Moleküle	29
1.6.5 Intrazelluläre Zytokinfreisetzung	29
2. Zielsetzung	31
3. Material und Methoden	32
3.1 Materialien	32
3.1.1 Peptide	32
3.1.2 Antikörper	33
3.1.3 Patientenmaterialien	34
3.1.4 Immunkompetenztest	34
3.1.5 Tetramere MHC Komplexe	35
3.1.6 Medien, Puffer und Lösungen	36
3.2 Methoden	37
3.2.1 Immunhistochemische Färbungen	37
3.2.2 Zellbiologische Arbeitstechniken	37
3.2.2.1 Tumorzellisolierung	37
3.2.2.2 Etablierung von Tumorzelllinien	37
3.2.2.3 Generierung von dendritischen Zellen	38
3.2.2.4 Generierung der Hybridzellen	38
3.2.2.5 Isolierung von Lymphozyten aus Blut	39
3.2.2.6 Isolierung von Lymphozyten aus Tumorgewebe	39
3.2.2.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen	39
3.2.2.8 Kultur von Standardzelllinien	40
3.2.2.9 Isolierung von antigenspezifischen T-Zellen	40
3.2.2.10 Generierung von antigenspezifischen T-Zellen	41
3.2.3 Chromfreisetzungsversuch	41
3.2.4 Durchflusszytometrie	42
3.2.4.1 Phänotypische Analyse von Oberflächenmolekülen	43
3.2.4.2 Phänotypische Analysen von intrazellulären Molekülen	43
3.2.4.3 Funktionelle Analyse von Lymphozyten	43
3.2.4.4 Tetramer-Färbung	44
3.2.4.5 Bestimmung der T-Helferzell-Aktivität	45
3.2.4.6 Auswertung der Fluoreszenzen	45
4. Ergebnisse	49
4.1 Peptid-Vakzination	49
4.1.1 Strategie	49
4.1.2 Patienten	50
4.1.3 Therapie	50

4.1.4 Klinisches Ansprechen	51
4.1.5 Immunhistologie	51
4.1.6 Induktion von Recall-Antigen-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen	52
4.1.7 Frequenzanalysen von Peptid-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen unter Therapie	56
4.1.7.1 Frequenzanalysen bei HLA-A1 ⁺ Patienten.....	56
4.1.7.2 Frequenzanalysen bei HLA-A2 ⁺ Patienten.....	57
4.2 Hybridzell-Vakzination.....	62
4.2.1 Strategie.....	62
4.2.2 Patienten.....	63
4.2.3 Therapie.....	63
4.2.4 Klinisches Ansprechen	63
4.2.5 Immunhistologie	64
4.2.6 Frequenzanalysen von Peptid-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen unter Therapie	66
4.2.6.1 Frequenzanalysen bei HLA-A*0201 ⁺ Patienten	67
4.2.6.1.1 Patient NRO	68
4.2.6.1.2 Patient UTR.....	70
4.2.7 Charakterisierung der Peptid-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	75
4.2.7.1 Färbung mit tetrameren MHC-Molekülen und intrazelluläre IFN γ -Messung	76
4.2.7.2 Charakterisierung TAA-spezifischer/IFN γ ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen mittels verschiedener Oberflächenmarker	78
4.2.7.3 Charakterisierung antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen nach Kurzzeit-Kultivierung	86
4.2.7.4 Untersuchung der Expression von killer inhibitory receptors auf TAA-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	87
4.2.8 Zytotoxische Aktivität der Peptid-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen.....	89
4.2.9 Reaktion der CD8 ⁺ T-Zellen auf autologe Tumorzellen.....	96
4.3 Antigen-spezifische CD8 ⁺ T-Zellen bei unbehandelten Melanompatienten.....	98
4.3.1 Patienten.....	98
4.3.2 Histologische Untersuchung der Metastasen.....	98
4.3.3 Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen im Blut	100
4.3.4 Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen im Tumor	101
5. Diskussion	106
5.1 Immuntherapien beim malignen Melanom.....	106
5.2 Peptid-Vakzination	107
5.3 Hybridzell-Vakzination.....	112
5.4 Charakterisierung der Peptid-spezifischen T-Zellen	116
5.5 Antigen-spezifische T-Zellen bei unbehandelten Melanompatienten	122
5.6 Bedeutung der Frequenzanalyse Antigen-spezifischer T-Zellen.....	123
6. Literatur	129

Abkürzungen

AICD	engl. Activation induced cell death
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATP	Adenosin-Triphosphat
BFA	Brefeldin A
Bq	Bequerel, Aktivität einer radioaktiven Substanz
BSA	engl. bovine serum albumine
CD	engl. cluster of differentiation
cDNA	engl. complementary deoxyribonucleic acid
CMV	engl. cytomegalo virus
CR	engl. complet response
CT	Coputertomographie
CTL	engl. cytotoxic T lymphocyte
CTLA	engl. cytotoxic T lymphocyte antigen
DC	Denditische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	engl. enzyme linked immunosorbent assay
ELISPOT	engl. enzyme linked immunospot
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	engl. fluorescence activated cell sorter
FCS	engl. fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GM-CSF	engl. granulocyte /macrophage-colony-stimulating factor
Gy	Grey, Einheit für Betrahlungsintensität
h	Stunde
HLA	engl. human lymphocyte antigen
HPLC	engl. high performance liquid chromatography
ICOS	engl. inducible co-stimulator
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
IL-R	Interleukinrezeptor
kDa	kilo-Dalton, Einheit für Molekülmasse
KIR	engl. killer inhibitory receptor
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
LDA	engl. limiting dilution assay
mAK	monoklonaler Antikörper
MEM α	engl. Minimum Essential Medium α modification
M Φ	Makrophage
MHC	engl. Major histocompatibility complex
MHC-I	Produkt des MHC-Klasse-I Gens
MHC-II	Produkt des MHC-Klasse-II Gens
mRNA	engl. messenger RNA
NK	engl. natural killer
PBMC	engl. peripheral blood mononuclear cells
PBS	engl. phosphate buffered saline
pCTL	engl. precursor CTL
PCR	engl. polymerase chain reaction
PD	engl. progredient disease
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
RNA	engl. ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
SD	engl. stable disease
TAP	engl. transporter associated with antigen processing
TCR	engl. T cell receptor
TGF	engl. transforming growth factor
Th	T Helferzelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	engl. unit, Einheit für Enzymaktivität

1. Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom (MM), welches erstmalig 1787 beschrieben wurde, ist ein von den pigmentbildenden Zellen (Melanozyten) der Haut, seltener der Schleimhaut, der Aderhaut und der Hirnhäute ausgehender neuroektodermaler Tumor mit lymphogener und hämatogener Metastasierung. Es stellt die aggressivste aller Hautkrebserkrankungen dar. Die Metastasierung dieses Tumors erfolgt in der Haut lokal, mit Satelliten um den Primärtumor oder auf dem Weg zu den regionalen Lymphknoten (In-Transit-Metastasen). Fernmetastasen werden meist in der Haut, der Lunge, der Leber sowie im Gehirn und Knochen gebildet. Die Stadieneinteilung der Erkrankung erfolgt nach klinischen (Metastasierung) und histologischen (Tumordicke) Kriterien. Die Stadien I a bis II b sind durch eine Tumordicke von 0,75 mm bis 4 mm oder größer und fehlende Metastasierung charakterisiert. Zum Stadium III a gehören Tumoren, die Satelliten-Metastasen und In-Transit-Metastasen in Lymphknoten bilden, während Stadium IV durch die Bildung von Organmetastasen charakterisiert ist. Zur Therapie dieser Erkrankung gehören in erster Linie die chirurgische Exzision und bei Metastasierung Chemo- und Immuntherapie. Je nach klinischem Stadium, Lokalisation und Geschlecht beträgt die Zehn-Jahres-Überlebensrate je nach Tumordicke im Stadium Ia-IIb 97%-28%, im Stadium IIIa/b 28-19% und im Stadium IV 3%.

Langzeitanalysen zeigen, dass die Neuerkrankungen seit 1973 mit einer Steigerungsrate von 3%-7% jährlich schneller zunehmen als andere Tumorerkrankungen (Ries *et al.*, 1991; Diepgen *et al.*, 2002). Die Verdopplungsrate der Neuerkrankungen liegt mit 10-20 Jahren sehr hoch, wobei das Auftreten stark vom Hauttypus und der geographischen Zone abhängt. Während in Australien 50 Neuerkrankungen pro Jahr pro 100 000 Einwohner beschrieben werden, liegt die Inzidenz der Neuerkrankungen in USA bei 13 und in Nordeuropa bei 5 Neuerkrankungen pro Jahr pro 100 000 Einwohner (Diepgen *et al.*, 2002). Die betroffenen Altersgruppen sind verglichen mit anderen Tumorarten relativ jung. Ungefähr 50% der MM kommen in Individuen unter 50 Jahren und 30% in Individuen unter 45 Jahren vor (Jemal *et al.*, 2001).

Die Ätiologie des Melanoms ist multifaktoriell. Das Risiko für das Auftreten einer Melanomerkrankung erhöht sich bei häufigem familiären Vorkommen, bei bestehenden kongenitalen Nävi, erhöhter Anzahl und Grösse der Nävi, bei Vorkommen von dysplastischen Nävi und übermäßiger UV-Licht Exposition in der Kindheit (Whiteman *et al.*, 2001; Gilchrest *et al.*, 1999). Von Familien mit einer hohen Melanominzidenz konnten Gene

isoliert werden, die eine Prädisposition für ein malignes Melanom kodieren (Halachmi *et al.*, 2001; Koh *et al.*, 1993). Bis jetzt wurden keine viralen Komponenten oder chemische Karzinogene in der Ätiologie des Melanoms beim Menschen identifiziert.

1.2 Die anti-Tumor Immunantwort

Von zentraler Bedeutung ist die Frage nach der Rolle der Immunabwehr bei der Tumorigenese. Es gibt viele Hinweise darauf, dass ein intaktes Immunsystem der Tumorentstehung entgegenwirken kann. Klinische, histologische sowie *ex vivo* zellulär-immunologische Untersuchungen lassen darauf schließen, dass zumindest zeitweise eine intensive Auseinandersetzung zwischen Immunsystem und Tumor stattfindet.

Im Gegensatz dazu wird bei Transplantationspatienten, die eine immunsuppressive Therapie erhalten, ein Anstieg der Hautkrebsrate von 7% nach einjähriger Therapie auf 45% nach 11 Jahren und schließlich auf 70% nach 20 Jahren Therapie beobachtet (Bouwes Bavinck *et al.*, 1996; McCann *et al.*, 1999). Weiterhin wurden beim malignen Melanom spontane Metastasen-Regressionen, die auf aktivierte T-Lymphozyten zurückzuführen waren, beschrieben. Die Behandlung von Melanompatienten mit *in vitro* aktivierten Tumorspezifischen T-Lymphozyten führte in vereinzelten Fällen zur Reduktion der Tumormasse (Rosenberg *et al.*, 1994). Ebenso führten die im Laufe der letzten Jahre entwickelten und eingesetzten Immuntherapien in vereinzelten Fällen zu positiven Therapieergebnissen (Salgaller *et al.*, 1996; Nestle *et al.*, 1998; Marchand *et al.*, 1999; Jäger *et al.*, 2002).

Bei verschiedenen Tumorentitäten, so z. B. beim Melanom und beim Nierenzellkarzinom, sind Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten (TIL) vorhanden und in diesen Infiltraten spezifische T-Zellen gegen Tumor-assoziierte Antigene identifiziert worden. Tumorspezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL - engl.: *cytotoxic T lymphocyte*) bilden die Haupteffektorzellen bei der Immunantwort gegen Tumoren. Die Induktion und Aktivierung dieser auch als CD8⁺ T-Lymphozyten bezeichneten Zellen ist für die Etablierung von Immuntherapien von großer Bedeutung. (Wang *et al.*, 2001 ; Jäger *et al.*, 2001)

1.2.1 Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten

Die Induktion von CTLs ist ein komplexer Vorgang, bei dem drei unterschiedliche Zelltypen miteinander interagieren müssen: Antigen-präsentierende Zelle (APC - engl.: *antigen presenting cell*), CD4⁺ T-Helfer-Lymphozyt (T_H) und CTL-Vorläuferzellen (pCTL - engl.: *precursor CTL*).

Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Lymphozyten erkennen ihr Antigen nicht in löslicher Form, wie dies bei B-Lymphozyten der Fall ist, sondern nur im Kontext mit MHC-Molekülen (engl.: *major histocompatibility complex*) auf anderen Zellen. Für die spezifische Aktivierung der T-

Zellen ist die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch den T-Zell-Rezeptor (TCR – engl.: *T cell receptor*) notwendig. Während MHC-I-Moleküle auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert werden, verfügen APCs sowohl über MHC-I-Moleküle, die Antigene an CD8⁺ T-Zellen präsentieren können, als auch über MHC-II-Moleküle, deren präsentierte Antigene von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden. Professionelle Antigen-präsentierende Eigenschaften zeigen die Makrophagen (MΦ), die B-Zellen und die dendritischen Zellen (DC - engl.: *dendritic cell*). Auf der Oberfläche dieser Zellen befinden sich kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86, die mit entsprechenden Liganden (CD28) auf den T-Zellen in Kontakt treten und zusammen mit dem TCR-MHC-Peptid-Komplex eine Aktivierung dieser Zellen induzieren. (Carreno *et al.*, 2002; Slavik *et al.*, 1999; Schultze *et al.*, 1996).

Die Auslösung eines Aktivierungssignals in der T-Zelle ist von Faktoren wie Antigendichte, der Anzahl der kostimulatorischen Moleküle auf der APC und der Anzahl der TCR-Moleküle auf der T-Zelle abhängig. In mehreren Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine hohe Anzahl kostimulatorischer Moleküle die Auslösung eines Aktivierungssignals in der T-Zelle auch bei geringer TCR-Anzahl bewirkt (Bachmann *et al.*, 1996; Grossman *et al.*, 1996; Waldrop *et al.*, 1998).

Die T-Helfer-Lymphozyten sind nach Aktivierung in der Lage, in Abhängigkeit von ihrem Zytokinprofil, die Immunreaktion in eine CTL-vermittelte oder eine humorale (Antikörper-vermittelte) Richtung zu dirigieren. Sie werden anhand der von ihnen sezernierten Zytokine in T_H1- und T_H2-Zellen eingeteilt. T_H1-Zellen produzieren vor allem die pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-2 (IL-2), Interferon-γ (IFNγ) und Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), wodurch die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von CTLs unterstützt wird. Anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 und *Transforming Growth Factor β* (TGF-β) werden von den T_H2-Zellen sezerniert. Durch diese Zytokine werden vor allem B-Zellen aktiviert und CTLs, insbesondere durch IL-10 und TGF-β, inhibiert. Da IFNγ und IL-4 entgegengesetzte Effekte zeigen, wird für die Einteilung von T_H1- und T_H2-Zellen vor allem die Expression dieser beiden Zytokine herangezogen. Jedoch trifft diese Einteilung auf dem Einzelzellniveau nicht immer zu, da einige T_H-Zellen beiden Gruppen zuzuordnen sind (Bucy *et al.*, 1994; Assenmacher *et al.*, 1994). Zumindest *in vitro* konnte gezeigt werden, dass IFNγ-produzierende T_H1-Zellen nach Stimulation mit IL-4 in der Lage sind, IL-10 zu produzieren und die Expression von IFNγ einzustellen (Assenmacher *et al.*, 1998).

Bei der Polarisierung der T_H-Antwort nimmt die APC durch Sekretion bestimmter Zytokine einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Immunantwort. MΦ und DC können IL-12 produzieren und damit die Differenzierung in T_H1-Zellen fördern (Hsieh *et al.*, 1993). B-

Zellen hingegen sezernieren IL-4 und lenken damit die Entwicklung der T_H-Zellen in Richtung einer T_H2-Antwort. Durch Sekretion von IL-18 sind B-Zellen aber auch in der Lage, T_H1-Zellen und damit auch eine CTL-Antwort zu induzieren. Die Effekte von IL-12 und IL-18 sind ähnlich (Kishida *et al.*, 2001), sie wirken indirekt über die T_H-Zellen auf die Induktion von CTLs (Germann *et al.*, 1993; Yanagida *et al.*, 1994; Mortarini *et al.*, 2000).

Der Einfluss von IL-12 auf die Entwicklung der T_H-Zellen dominiert zumindest *in vitro* über den von IL-4, wobei IL-12 die Expression von IFN γ durch die T_H-Zellen stark erhöht (Seder *et al.*, 1993). Die Qualität der T_H-Antwort wird zusätzlich von der Antigendichte auf der APC beeinflusst (Constant *et al.*, 1995; DiMolfetto *et al.*, 1998). Eine T_H2-Antwort wird durch eine hohe Antigendichte auf der APC, welche die Produktion von IL-4 induziert und die von IFN γ erniedrigt, begünstigt. Eine geringere Antigendichte hat den umgekehrten Effekt und leitet eine T_H1-Antwort ein.

Für die Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten aus CTL-Vorläuferzellen (pCTL - engl.: *precursor* CTL) sind drei verschiedene Signale notwendig: a) eine Antigen-spezifische Stimulation des T-Zell-Rezeptors nach Erkennung eines Peptid-MHC-Komplexes, b) ein Ko-stimulatotrisches Signal vermittelt durch die CD28-CD80/CD86 Interaktion, sowie c) ein Signal, welches über die Interaktion von IL-2 mit dem IL-2 Rezeptor (IL-2R) induziert wird. Dies führt zur Proliferation und zur Differenzierung der Antigen-aktivierten pCTL zu einer Effektor-CTL. Nicht-aktivierte pCTLs produzieren kein IL-2 oder IL-2R, proliferieren nicht und zeigen keine zytotoxische Aktivität.

Die Aktivierung über ein Antigen induziert in der pCTL die Expression des IL-2R und die Produktion geringer IL-2-Mengen. Generell wird für die Differenzierung und Proliferation der Zelle zusätzliches IL-2 benötigt. Antigen-aktivierte, proliferierende T_H1-Zellen produzieren große Mengen an IL-2 und liefern somit „Hilfe“ für die Induktion von CTLs. Der genaue Mechanismus der Aktivierung ist jedoch noch nicht geklärt. Von der Antigen-präsentierenden Zelle werden sowohl den T_H-Zellen als auch den CTL die jeweils spezifischen Antigene im Komplex mit MHC-II- bzw. MHC-I-Molekülen präsentiert. Bisher wurde angenommen, dass beide T-Zellen simultan an die APC binden müssen und die T_H-Zellen, durch die Produktion von IL-2 und IFN γ , die CTL über die räumliche Nähe aktivieren (Stuhler & Walden, 1993). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die APC durch den Kontakt mit der T_H-Zelle über CD40-40L „aktiviert“ wird und in diesem Zustand die CTL ohne den gleichzeitigen Kontakt mit einer T_H-Zelle aktivieren kann (Ridge *et al.*, 1998; Schoenberger *et al.*, 1998; Bennett *et al.*, 1998). Die Interaktion von CD40 mit CD40L induziert bei der APC die Expression von kostimulatorischen Molekülen (Shinde *et al.*, 1996), die essentiell für eine effektive Stimulation der CTL sind. Durch die Bindung von CD11a/CD18 (LFA-1) und CD2 auf der T-Zelle an CD54 (ICAM-1) bzw. CD58 (LFA-3) auf der APC wird der Zell-Zell-Kontakt

verstärkt. Eine Erhöhung der IL-2 Expression wird durch die Interaktion von CD80/CD86 auf der APC mit CD28 auf der T-Zelle erreicht (June *et al.*, 1990). Gleichzeitig wird dadurch das TCR-Erkennungssignal verstärkt (Viola *et al.*, 1999; Lanzavecchia *et al.*, 1999) und somit eine effektive Aktivierung induziert. Zusätzlich werden die anti-apoptotischen Proteine der bcl-Familie exprimiert, wodurch der aktivierungsinduzierte Zelltod (AICD - engl. *Activation Induced Cell Death*) verhindert wird. Im Gegensatz dazu hat CD152 (CTLA-4 - engl.: *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*), das ebenfalls an CD80/CD86 bindet, eine regulative Wirkung. Es wird angenommen, dass CD152 an der Induktion von Toleranz durch den AICD beteiligt ist, indem es die IL-2 Expression und den Zellzyklus inhibiert (Walunas & Bluestone, 1998).

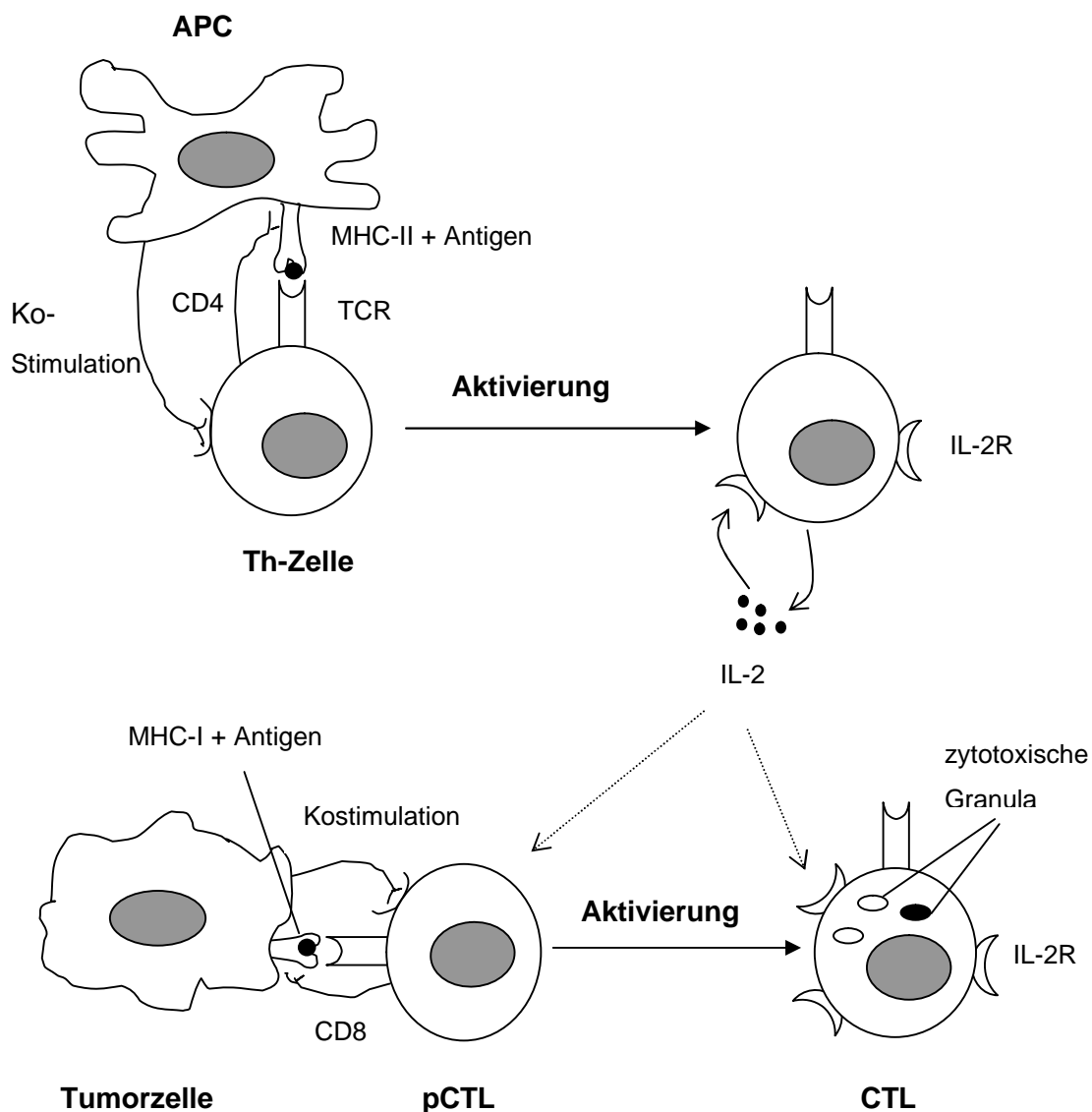


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten.

Infolge der TCR-vermittelten Aktivierung werden weitere kostimulatorische Moleküle, wie CD27 (Hintzen *et al.*, 1993), 4-1BB (CD137; Pollok *et al.*, 1993) und ICOS (engl.: *inducible co-stimulator*; Hutloff *et al.*, 1999) sowohl auf T_H-Zellen als auch auf CTLs exprimiert. Die Funktion dieser Moleküle ist noch nicht vollständig geklärt.

Bekannt ist, dass CD27 an CD70 bindet, welches ebenfalls nach der Aktivierung von T-Zellen, aber auch von B-Zellen exprimiert wird. Die Expression wird durch IL-1b, IL-12 und TNF α gefördert, IL-4 dagegen hat einen inhibierenden Effekt (Lens *et al.*, 1997). Die Interaktion zwischen CD27 und CD70 scheint vor allem für die CTL-Induktion wichtig zu sein und fördert die Proliferation der Zellen. LENS und Kollegen postulierten, dass aktivierte T-Zellen über CD27-CD70 direkt miteinander kommunizieren und sich so während der Proliferationsphase gegenseitig kostimulatorische Signale bieten (Lens *et al.*, 1998).

4-1BB dient der Aufrechterhaltung von Immunreaktionen in der Abwesenheit von CD28. Dieses Molekül wird nach der CD28-CD80/86 Interaktion auf aktivierten T-Zellen exprimiert (Pollok *et al.*, 1993). 4-1BB bindet an den 4-1BB-Liganden, der von reifen B-Zellen, M Φ und DCs (Pollok *et al.*, 1994) aber auch von aktivierten T-Zellen (Goodwin *et al.*, 1993) exprimiert wird. Die Interaktion induziert bei der aktivierten T-Zelle die Expression der bcl-Familie und verhindert damit – ähnlich wie CD28 – den AICD.

Ebenfalls eine Ähnlichkeit zu CD28 weist das erst kürzlich beschriebene Molekül ICOS auf (Hutloff *et al.*, 1999). Die Expression von ICOS scheint mit der von CD28 assoziiert zu sein und erhöht die Bildung von IL-4, IL-5, IL-10, IFN γ , TNF α und GM-CSF. Im Gegensatz zu CD28 hat es aber keinen Effekt auf IL-2. ICOS⁺ Zellen befinden sich im lymphatischen Gewebe hauptsächlich in den B-Zellarealen, in den T-Zellarealen ist der Anteil geringer. Ob ICOS bei der Differenzierung von T-Zellen eine Rolle spielt, ist noch nicht geklärt.

1.2.2 Effektorfunktion zytotoxischer T-Lymphozyten

Die Aktivierung der pCTL erfolgt durch die Erkennung ihres spezifischen Antigens und durch das von den T_H-Zellen produzierte IL-2. Nach der Expression des hochaffinen IL-2R (CD25) beginnt die Zelle zu proliferieren und differenziert zur reifen CTL. CD28, wichtig für die Bindung an die kostimulatorischen Moleküle CD80/86 auf den APCs, wird zu Beginn der Differenzierung stark exprimiert, im weiteren Verlauf jedoch nicht mehr.

Weiterhin exprimieren die Zellen CD54 (ICAM-1, Adhäsionsmolekül) und CD44 (H-CAM, Adhäsionsmolekül), welche das *homing* zu den peripheren lymphatischen Organen und Entzündungsstellen vermitteln, CD11a (α -L-Integrinkette, α -Kette von LFA-1), CD95L (Ligand für CD95, induziert Apoptose) und CD62L (L-Selektin, Adhäsionsmolekül und *homing*-Marker) (Oughton & Kerkvliet, 1999).

Nach ihrer Reifung verlassen die CTLs die sekundären lymphatischen Organe und wandern in die Peripherie. CTLs produzieren IFN γ und TNF α , wodurch die Expression von MHC-Molekülen auf APCs erhöht wird. Die zytotoxische Aktivität der CTLs wird durch die Freisetzung von zytotoxischen Granula, die Perforin und Granzyme enthalten, vermittelt (Henkart, 1985). Die CTLs selbst zeigen eine gewisse Resistenz gegen die Auswirkung dieser Granula (Verret *et al.*, 1987). Nach der Erkennung des spezifischen Antigens polarisiert die CTL, d.h. die zytotoxischen Granula werden auf der Seite der Zelle konzentriert, auf der der Antigenkontakt stattgefunden hat. Danach werden die Granula in den interzellulären Raum zwischen CTL und Zielzelle ausgeschüttet und können gerichtet die Zielzelle angreifen. Dabei werden durch die Einlagerung der Perforin-Moleküle in der Membran der Zielzelle Poren gebildet. Dadurch kommt es zum Einstrom von Ionen, insbesondere Ca²⁺ (Esser *et al.*, 1998;). Darüber hinaus können die Granzyme so in die Zielzelle eindringen und in dieser Apoptose induzieren (Hishii *et al.*, 1999). Stark aktivierte CTLs sind in der Lage, nacheinander mehrere Zielzellen zu zerstören (Koren *et al.*, 1973). Nach der Effektorphase werden die CTL zum größten Teil vermutlich durch AICD eliminiert. Ein geringer Anteil an CTLs scheint jedoch dem AICD zu entgehen und in Gedächtniszellen zu differenzieren, die mehrere Jahre überleben können (Opfermann *et al.*, 2001). Die CTL-Anzahl kann ebenfalls durch CD95-induzierte Apoptose reguliert werden, da CTLs neben CD95 auch CD95L exprimieren. (Carter *et al.*, 1998 ; Di Somma *et al.*, 1999).

1.3 Tumorantigene

Unabdingbare Voraussetzung für die Generierung einer spezifischen Immunantwort ist das Vorhandensein antigener Strukturen im Tumor. Alle Antigene, die auf Tumorzellen vorkommen und eine spezifische Antwort zytotoxischer T-Lymphozyten auslösen, werden als Tumorantigene bezeichnet. Sie werden sowohl von den Tumorzellen selbst (über MHC-I-Moleküle) als auch von spezialisierten Antigen-präsentierenden Zellen (über MHC-I und MHC-II-Moleküle) den T-Lymphozyten präsentiert. Prinzipiell kann man zwischen Tumorspezifischen und Tumor-assoziierten Antigenen unterscheiden. Tumor-spezifische Antigene werden nur von Tumorzellen infolge ihrer Pathophysiologie exprimiert, Tumor-assoziierte Antigene hingegen können auch von nicht-transformierten Zellen exprimiert werden. Beim Melanom konnten mit Hilfe von spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten zahlreiche Tumor-Antigene identifiziert werden. Derartige Tumoren werden als stark immunogen bezeichnet, da sie in der Lage sind, eine Immunantwort zu induzieren. Tumoren wie das Mammakarzinom dagegen sind nur schwach immunogen, d.h. sie können nur eine schwache Immunreaktion hervorrufen. Die Ursache für die Unterschiede bezüglich der Immunogenität verschiedener Tumoren ist noch ungeklärt. (Wu *et al.*, 2001)

Die Identifizierung von Tumor-Antigenen stellt eine große Errungenschaft für die Tumor-Immunologie dar. Es konnten darüber hinaus die Peptidsequenzen, die eine T-Zellreaktion auslösen, genau definiert werden. Die Tumor-Antigene dienen nicht nur dem besseren Verständnis der Tumorbilogie, sondern ermöglichen auch die Entwicklung von Immuntherapien, die eine spezifische T-Zellantwort induzieren können. Die meisten Verfahren für die Isolierung Tumor-spezifischer Antigene gehen von Tumor-spezifischen CTL-Klonen aus.

1.3.1 Melanom-assoziierte Antigene

Die identifizierten Melanom-assoziierten Antigene (MAA) können in drei Kategorien eingeteilt werden: Tumor-assoziierte Tumor/Testis-Antigene (MAGE, BAGE, GAGE, PRAME und NY-ESO-1), melanozytäre Differenzierungs-Antigene (Tyrosinase, Melan A/MART 1, gp100, TRP 1 und TRP 2) und mutierte oder aberrant exprimierte Antigene (MUM-1, CDK4, β -Catenin, p15, N-Acetylglukosaminyl-Transferase V (GnT-V), gp100-in4). Diese Antigene beinhalten eine große Anzahl von Epitopen, die eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen auslösen.

1.3.1.1 Tumor-assoziierte Tumor/Testis-Antigene

Zu dieser Gruppe von Antigenen gehören Proteine, die in zahlreichen Tumoren und in den Testis exprimiert werden, jedoch nicht im normalen Gewebe (Brasseur *et al.*, 1992; Traversari *et al.*, 1992; De Smet *et al.*, 1994; Weynants *et al.*, 1994). Eine weitere gemeinsame Eigenschaft der Gene aus der MAGE-Genfamilie und verwandter Gene wie BAGE, GAGE und PRAME ist die Lokalisation auf dem X-Chromosom (Lurquin *et al.*, 1997; Lethe *et al.*, 1998). Ihre Funktion konnte jedoch bis jetzt nicht geklärt werden. Weitere Antigene mit dem gleichen Expressionsmuster sind SSX2/HOM-MEL-40 (Sahin *et al.*, 2000; Tureci *et al.*, 1996) und NY-ESO-1 (Chen *et al.*, 1997). Die Expression der MAGE-Antigene wurde in unterschiedlichen Studien untersucht. Sie werden in hohem Maße (für MAGE-3 bis zu 65%) in kutanen Melanomen, jedoch nicht in uvealen Melanomen exprimiert (De Plaen *et al.*, 1994; Mulcahy *et al.*, 1996). Des Weiteren wurde eine geringe Expression der MAGE-1 Antigene in anderen Tumoren, wie Mammakarzinom, Lungenkarzinom, Oesophaguskarzinomen, Kolonkarzinomen und Prostatakarzinomen, beobachtet (Brasseur *et al.*, 1992; Traversari *et al.*, 1992; Boon, 1993; Van Pel *et al.*, 1995). Eine hohe Expression des MAGE-1 Antigens (80%) wurde beim Leberzellkarzinom gefunden (Yamashita *et al.*, 1996). Auch das MAGE-3 Antigen wurde außer beim Melanom mit einer hohen Häufigkeit bei „head and neck squamous cell“ Karzinoma gefunden (Van den Eynde und Van der Bruggen, 1997). Nach Vakzinationsstudien mit den Antigenen MAGE-1 und MAGE-3 bei Melanompatienten, zeigte sich nur für das MAGE-3 Peptid EVDPIGHLIY eine Immunantwort

in vivo, jedoch mit einer niedrigen anti-Tumoraktivität (Marchand *et al.*, 1999; Thurner *et al.*, 1999). Der niedrige Expressionslevel von MAGE-1 auf manchen Tumoren könnte eine Erklärung für die schwache immunogene Eigenschaft dieses Antigens darstellen (Lethe *et al.*, 1997; Sykulev *et al.*, 1996).

Die Untersuchungen von SCHULTZ-THATER und Kollegen ergaben für das MAGE-1 Genprodukt eine zytoplasmatische Lokalisation, während für MAGE-3 eine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation gefunden wurden (Schultz-Thater *et al.*, 1994; Kocher *et al.*, 1995). Generell wurde eine negative Korrelation zwischen der proliferativen Kapazität der Melanomzellen und dem Expressionsstatus des MAGE-3 Genprodukts festgestellt, was auf eine wachstumshemmende Funktion dieses Proteins schließen lässt. Ebenfalls wurde eine Ähnlichkeit zwischen den MAGE-Genprodukten und dem Tumor-Suppressorprotein p53 beschrieben, welches unspezifisches Wachstum von Zellen hemmt (Walker *et al.*, 1996). Diese Ähnlichkeit deutet auf eine mögliche Beteiligung der MAGE-Proteine bei der Kontrolle der Proliferation von Tumorzellen hin. Diese Gene werden möglicherweise als zusätzlicher Wachstums-Inhibitionsmechanismus bei Verlust der „professionellen“ Wachstumshemmer p53 und/oder p16/Rb eingeschaltet. Untersuchungen von BARTKOVA und Kollegen zeigten, dass Tumoren, die eine hohe Expression von MAGE-Genprodukten aufweisen nur eine geringe Menge an p16 exprimieren (Bartkova *et al.*, 1996).

Ein anderes Verfahren ermöglicht über die serologische Analyse von rekombinanten cDNA-Expressionsbibliotheken der Keimbahngene mit autologen Antikörpern (SEREX - *engl.: serological analysis of recombinant cDNA expression libraries*) die Identifizierung von neuen Tumor-Antigenen (Pfreundschuh *et al.*, 1978). Eines dieser Antigene ist das in vielen Tumoren exprimierte NY-ESO-1 (Chen *et al.*, 1997). Hierfür wurden 2 HLA-A31 restringierte CTL-Epitope (Wang *et al.*, 1998) und 3 HLA-A2 restringierte Epitope identifiziert (Jäger *et al.*, 1998). NY-ESO-1 wird in 34% der Melanome, in 30% der Mammakarzinome, in 25% der Prostatakarzinome und in fast 80% der Blasenkarzinome exprimiert (Chen *et al.*, 1997). Das HOM-MEL-40 Antigen (Sahin *et al.*, 1995) wird ebenfalls nur in Testis und Tumoren (in 50% der Melanome) exprimiert und scheint eine Rolle bei der negativen Kontrolle der Proliferation zu übernehmen. Bis jetzt wurden keine spezifischen CTLs gegen dieses Antigen identifiziert.

Warum Testis-spezifische Gene in Tumoren exprimiert werden ist noch nicht ganz aufgeklärt. Für die Gene der MAGE- und GAGE-Genfamilien wurde eine Demethylierung der Promotorregion dieser Gene festgestellt (Weber *et al.*, 1994; Lucas *et al.*, 1998). Dieser Prozess wird von einer in vielen Tumoren vorkommenden allgemeinen Demethylierung der DNA gefolgt (de Smet *et al.*, 1996).

Aus immunologischen Gesichtspunkten bieten die MAGE-Antigene und verwandte Antigene gute Ansatzpunkte für eine Immuntherapie, da sie in vielen Tumoren vorkommen und außer den Testis nicht in normalen Gewebsarten exprimiert werden. Ein direkter Kontakt zwischen Immunzellen und testikulären Zellen findet nicht statt (Barker *et al.*, 1977) und die Keimzellen, die einzigen MAGE-positiven Zellen in den Testis, exprimieren keine MHC Klasse I Moleküle (Tomita *et al.*, 1993). Eine durch Immuntherapie induzierte Immunantwort gegen diese Antigene würde somit nicht zur Schädigung von gesundem Gewebe führen. Allerdings konnten bis jetzt, durch den Einsatz dieser Antigene, nur geringe Therapieerfolge erzielt werden, was auf eine geringe Immunogenität dieser Antigene hindeutet.

1.3.1.2 Melanozytäre Differenzierungs-Antigene

Die Erkennung von Peptiden aus Proteinen, die während der Differenzierung der Melanozyten exprimiert werden, ist für viele CTL-Linien und -Klone bewiesen worden (Anichini *et al.*, 1993).

Tyrosinase wurde als erstes melanozytäres Differenzierungs-Antigen, das von Tumor-spezifischen CTLs erkannt wird, beschrieben (Brichard *et al.*, 1993). Das Enzym, ein Protein bestehend aus 529 Aminosäuren, ist für die Synthese des Hautpigments Melanin verantwortlich (Bouchard *et al.*, 1989). Aus diesem Protein wurden später zwei Nonapeptide als Epitope für HLA-A*0201 restringierte CTLs identifiziert (Wölfel *et al.*, 1994). In der Zwischenzeit wurden Epitope für HLA-A*01, HLA-A*24 und HLA-B*44 restringierte CTLs nachgewiesen (Kittlesen *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 1995; Brichard *et al.*, 1996). Tyrosinase ist bis jetzt das einzige bekannte melanozytäre Differenzierungs-Antigen, das auch von CD4⁺ Tumor-spezifischen T-Zellen erkannt wird, da es Epitope enthält, die über MHC Klasse II Moleküle präsentiert werden (Topalian *et al.*, 1994). Aus TILs isolierte CD4⁺ T-Zellen, die eine Reaktion auf HLA-DR0401⁺ Melanomzellen zeigten, wurden für die Identifizierung von Melanom-Antigenen eingesetzt, die auch von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden. Allgemein ist die Generierung einer Tyrosinase-spezifischen Immunantwort bei Melanompatienten nach Immuntherapien ein eher seltenes Ereignis und wurde bis jetzt nur bei Patienten beobachtet, die eine Antwort auf viele Melanom-assoziierte Antigene aufwiesen (Robbins *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1999).

Am häufigsten wurde bei Melanompatienten eine Immunreaktion gegen das Antigen Melan A/MART-1 gefunden. Dieses 118 Aminosäuren große Protein, dessen Funktion noch unbekannt ist, weist eine 21 Aminosäuren lange transmembrane Region auf (Coulie *et al.*, 1994; Kawakami *et al.*, 1994a). Für dieses Antigen wurde eine deutliche Immundominanz in HLA-A*0201-positiven Patienten festgestellt (Kawakami *et al.*, 1994b). Das Nonamer 27-35 dieses Proteins mit der Sequenz AAGIGILTV zeigte sich als immundominantes Epitop für

Tumor-spezifische TILs (Kawakami *et al.*, 1994b). Sowohl aus PBMCs von Melanompatienten als auch von gesunden Probanden konnten *in vitro* mit diesem Peptid spezifische CTL-Klone induziert werden (Rivoltini *et al.*, 1995; Rivoltini *et al.*, 1999; van Elsas *et al.*, 1996). Bei diesen Untersuchungen zeigte sich auch, dass andere Melan A/MART-1 Peptide mit einer höheren Affinität für das HLA-A*0201 Molekül, keine spezifischen CTLs induzieren konnten. Daraus lässt sich folgern, dass sowohl T-Zellen mit einem stark affinen als auch T-Zellen mit einem niedrig affinen T-Zellrezeptor für körpereigene Antigene vorhanden sind. Diesbezüglich zeigten VALMORI und Kollegen, dass das Peptid 26-35 dieses Antigens mit der Sequenz EAAGIGILTV und das analoge Peptid ELAGIGILTV besser von spezifischen CTLs erkannt werden als das natürliche Epitop Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ (Valmori *et al.*, 1998a, 1998b).

Unter den melanozytären Differenzierungs-Antigenen zeigen die Melan A/MART-1 Peptide die höchste Immunogenität mit einer effektiven Induktion Tumor-spezifischer CTLs (Spagnoli *et al.*, 1995; Rivoltini *et al.*, 1999). Die protektive Funktion dieser CTLs konnte nur in vereinzelten Fällen mit einer Tumorregression in Zusammenhang gebracht werden (Wang *et al.*, 1999; Nestle *et al.*, 1998; Cormier *et al.*, 1997).

Das Antigen gp100, ein 661 Aminosäure großes Glykoprotein, erfüllt eine enzymatische Funktion bei der Melaninsynthese. Das Genprodukt von gp100 wurde ursprünglich als melanozytäres Differenzierungs-Antigen mit den Melanomdiagnose-Antikörpern HMB-45 und HMB-50 entdeckt. Später zeigte sich, dass dieses Antigen auch von spezifischen T-Zellen erkannt wird. Von KAWAKAMI und Kollegen wurde gp100 durch die Untersuchung von cDNA-Expressionsbibliotheken mit Melanom-spezifischen T-Zellen identifiziert (Kawakami *et al.*, 1994a). Unabhängig davon wurde gp100 von Cox und Kollegen durch Elution von Peptiden von einem HLA-A*0201-positiven Melanom, und anschließender Identifizierung mit spezifischen T-Zellen, charakterisiert (Cox *et al.*, 1994). Für das gp100-Protein konnten multiple CTL-Epitope identifiziert werden, die nicht nur HLA-A*0201 sondern auch HLA-A*0301 und HLA-A*24 restringiert sind (Kawakami *et al.*, 1995; Skipper *et al.*, 1996; Robbins *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 1997; Kawakami *et al.*, 1998). Dieses Antigen scheint für eine Immuntherapie sehr viel versprechend zu sein. Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen der T-Zellerkennung von gp100 *in vitro* und der Tumorregression von Patienten, die mit entsprechenden TILs therapiert wurden, festgestellt (Kawakami *et al.*, 1995).

Generell wird den melanozytären Differenzierungs-Antigenen nur eine geringe immunologische Aktivität in der Tumorabwehr zugewiesen, da eine Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen diese Funktion verhindern könnte. Jedoch wurde in einigen Fällen gezeigt, dass sie im Tumor eine spezifische Immunantwort auslösen können und vermutlich

durch eine „inflammatorische Umgebung“ im Tumor diese Toleranz durchbrochen wird. Da diese Proteine auch von gesunden Zellen exprimiert werden, kann es ebenfalls zur Elimination dieser Zellen kommen. Dies konnte bei Melanompatienten festgestellt werden, bei denen es im Verlauf einer Immuntherapie zur Vitiligo kam (Rosenberg & White, 1996; Yee *et al.*, 2000). Die Differenzierungs-Antigene werden gewebespezifisch exprimiert und können daher den T-Zellen bei ihrer Reifung im Thymus nicht präsentiert werden. Es wurde nachgewiesen, dass es auch bei gesunden Probanden autoreaktive T-Zellen gibt, die melanozytäre Differenzierungs-Antigene spezifisch erkennen, bei denen jedoch Toleranz oder Anergie infolge fehlender Kostimulation induziert wurde (Visseren *et al.*, 1995; Marincola *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 1998). Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Lyse von entsprechenden Zielzellen durch spezifische CTLs abhängig von der Konzentration dieser Peptide ist, und nur bei relativ hohen Peptidkonzentrationen stattfindet (Kawakami & Rosenberg, 1996).

1.3.1.3 Mutierte oder aberrant exprimierte Antigene

Das Vorkommen von mutierten Melanom-spezifischen Antigenen ist bei dieser Erkrankung kein seltenes Ereignis (Anichini *et al.*, 1996). Die Antigene sind gewöhnlich in Primärtumoren vorhanden und möglicherweise signifikant für die Entstehung/Progression des Tumors. Daher sind sie von großer Bedeutung nicht nur für Immuntherapien, sondern auch für das Verständnis der malignen Transformation. Es wird angenommen, dass in vielen Fällen die Mutationen von Onkogenen und Zellzyklus-regulierenden Genen in Zusammenhang mit der Tumortransformation stehen (Hunter, 1991). Mutationen in regulatorischen Bereichen der Onkogene können zur aberranten Transkription dieser Gene und als Folge davon zu einer Disregulation des Zellzyklus führen. Durch Punktmutationen im codierenden Bereich kann es zu einem Aminosäureaustausch oder einer Verschiebung des Leserasters innerhalb eines Gens kommen (Mayrand & Green, 1998). I.d.R. werden die resultierenden Proteine dadurch in ihrer Funktion gestört, doch sofern das kodierende Gen noch transkribiert und die mRNA translatiert wird, können die Peptidfragmente – die bei der Degradation des Proteins entstehen – von den MHC-Molekülen präsentiert werden und so eine Immunantwort auslösen. Auch Peptide aus kryptischen Translationsprodukten (Malarkannan *et al.*, 1995) oder gar aus Intron-Bereichen können Antigene für CTLs sein (Guilloux *et al.*, 1996; Robbins *et al.*, 1997). Inwieweit solche Antigene die Pathophysiologie der Tumorzellen reflektieren oder auch unter normalen Bedingungen entstehen, ist bislang nicht eindeutig geklärt.

Die Identifizierung vieler Tumor-Antigene in den letzten 6 Jahren ermöglicht die Untersuchung der Immunogenität verschiedener Tumore und die nachfolgende Auswahl der richtigen Antigene für eine Immuntherapie. Ebenfalls kann mit diesen Antigenen das

Vorkommen von Tumor-spezifischen CTLs bei Tumorpatienten untersucht werden. Ein Immunmonitoring bei immuntherapierten Melanompatienten mit Untersuchung der Frequenzen von Antigen-spezifischen T-Zellen kann Aufschluss über die Effektivität der Immuntherapie geben.

1.4 Tumor-escape Mechanismen beim malignen Melanom

Trotz der vielfach nachgewiesenen Tumor-spezifischen Immunzellen ist in den meisten Fällen eine Progression der Tumorerkrankung zu beobachten. Der Tumor entsteht und wächst in Gegenwart eines weitgehend intakten Immunsystems. Die Ursachen hierfür sind zur Zeit noch nicht aufgeklärt. Es werden jedoch verschiedene Hypothesen in der Literatur diskutiert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Tumor-escape Mechanismen

Aktive Mechanismen	Passive Mechanismen
? Expression von pro-apoptotischen Molekülen	? HLA-Verlust/Herunterregulation
? Freisetzung von immunsuppressiven Zytokinen	? Inadäquate Expression von kostimulatorischen Molekülen
? Prostaglandin-Produktion	? Lokalisation des Tumors an immunprivilegierten Stellen
? Freisetzung inhibitorischer Neuropeptide	? Expression von antagonistischen Peptiden ? Immunologische Ignoranz oder Abweichung

Aktive tumor-escape Mechanismen beinhalten die Sekretion mehrerer immunsuppressiver Substanzen (Kiessling *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2001), wie Zytokine, Prostaglandine und andere Verbindungen, welche signifikant die Aktivität der T-Zellen beeinträchtigen.

Ein vor kurzem beschriebener aktiver Mechanismus des Tumors zur Bekämpfung von Immunzellen ist die Expression von pro-apoptotischen Molekülen, wie FasL, auf der Tumorzelle (Rabinowich *et al.*, 1998; O'Connell *et al.*, 1999). Der Fas-Ligand, welcher eine zentrale Rolle bei der Homöostase des Immunsystems und bei der negativen Regulation von unterschiedlichen physiologischen Immunfunktionen spielt, induziert bei Zellen, die Fas exprimieren, den Zelltod durch Apoptose. Melanomzellen, die FasL exprimieren, können somit aktivierte T-Zellen, bei denen Fas hochreguliert wird, wirksam über den Fas/FasL-Mechanismus eliminieren (Hahne *et al.*, 1996). Im Widerspruch zu dieser Hypothese konnte jedoch gezeigt werden, dass Tumor-infiltrierende Lymphozyten vorhanden sind und dass

diese Zellen auch eine Tumorregression induzieren können (Whiteside & Parmiani, 1994; Kawakami *et al.*, 1994). Beim Melanom wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellklone nachgewiesen, die gegen eine FasL-induzierte Apoptose resistent sind (Rivoltini *et al.*, 1998). Auch andere Arbeiten (Thomas & Hersey, 1998; Ferrarini *et al.*, 1999) konnten belegen, dass der Fas/FasL-Mechanismus keine zentrale Rolle im *immune escape* des Melanoms spielt.

LIOTTA und Kollegen diskutieren als mögliche Ursache für eine ineffektive T-Zellantwort die Umgebung des Tumors (*tumor microenvironment*) (Liotta *et al.*, 2001). Stroma und Tumorgewebe tauschen Enzyme und Zytokine aus, wodurch die lokale extrazelluläre Matrix verändert, das Migrationverhalten von Zellen beeinflusst und Proliferation sowie Überleben der Tumorzellen gefördert werden.

Wichtigere *tumor escape*-Mechanismen scheinen die Herunterregulation von HLA-Allelen (Ferrone & Marincola, 1995), Defekte in der Antigen-Prozessierung und Präsentation (Bennink *et al.*, 1993) und der Verlust von kostimulatorischen Molekülen wie CD80/CD86 (Chen *et al.*, 1994) zu sein. Diese Prozesse kommen beim Melanom häufig vor und erschweren die Erkennung dieser Zellen durch das Immunsystem. Das Vorhandensein von Tumorvarianten, die einen Antigen- oder HLA-Verlust aufweisen, konnte *in vivo* festgestellt werden und wurde häufig als Konsequenz von Antigen-spezifischen Immuntherapien beobachtet (Restifo *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998). Diese Daten zeigen, dass Tumorspezifische T-Zellen in bestimmten Tumorarealen aktiv sein können und es *in vivo* zu einer Selektion und zum Wachstum von Antigen-negativen Tumorzellen kommen kann. Andererseits wird in vielen Fällen ein Fortschreiten der Krankheit und ein Ausbleiben der Reaktion auf eine Immuntherapie auch in Gegenwart von Antigen- und HLA-exprimierenden Tumorzellen beschrieben, so dass auch andere Mechanismen für ein *tumor escape* in Betracht gezogen werden müssen (Kono *et al.*, 2002).

Da die meisten Antigene, die von Tumor-spezifischen T-Zellen erkannt werden, körpereigene Antigene darstellen, ist wahrscheinlich ein regulatorischer Mechanismus für die schwache CTL-Antwort *in vivo* verantwortlich (Rivoltini *et al.*, 1998c). Einige Daten deuten darauf hin, dass physiologische Kontrollmechanismen die Autoreaktivität der Tumor-spezifischen T-Zellen unterdrücken und eine Toleranz gegenüber Tumor-Antigenen induziert wird (Anichini *et al.*, 1999b; Lee *et al.*, 1999).

Die Erkennung der Melanom-assoziierten Antigene durch spezifische T-Zellen wird in vielen Fällen als unvollständig und fehlerhaft beschrieben (Gervois *et al.*, 1996). Eine niedrige Affinität des TCR für die Tumor-Peptide, Defizienz in der IL-2-Produktion, fehlende Ko-

Stimulation und die Expression von antagonistisch wirkenden Peptiden auf der Tumorseite können zu einer Toleranz gegenüber Tumor-assoziierten Antigenen führen (Madrenas *et al.*, 1996; Loftus *et al.*, 1998). Für das immundominante Peptid Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ wurden natürliche analoge Peptide mit antagonistischer Wirkung identifiziert (Loftus *et al.*, 1996). Diese Antagonisten sind *in vitro* in der Lage, die zytotoxische Wirkung der Tumorspezifischen CTLs aufzuheben und einen Anergie-Status zu induzieren. Dieser ist charakterisiert durch die Unfähigkeit der Zellen, IL-2 als Antwort auf native Melanom-assoziierte Antigene zu produzieren (Loftus *et al.*, 1998).

Das Zytokin IL-10 wurde in vielen untersuchten malignen Melanomen nachgewiesen (Chen *et al.*, 1994; Dummer *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu wurden in gesunden Melanozyten nur geringe Mengen an IL-10 mRNA detektiert, jedoch kein IL-10. Patienten mit malignem Melanom zeigen hohe IL-10 Titer im Serum (Yue *et al.*, 1997). Das Zytokin könnte eine Rolle bei der Progression des Melanoms spielen, da durch die Einwirkung von IL-10 die Produktion der T_H1-Zytokine (IL-2, IFN γ , TNF α) herunterreguliert und eine Aktivierung der CTLs verhindert wird. IL-10 hat allgemein eine regulatorische Wirkung auf die T-Zell-Proliferation (Mahatany *et al.*, 1996).

Eine funktionelle Störung der CTL-Aktivität wurde bei einigen Tumorerkrankungen durch den Verlust der CD3-zeta-Kette des TCR/CD3-Komplexes der T-Zellen festgestellt (Kuss *et al.*, 1999). Bei Melanompatienten in einem sehr fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung wurde ein signifikanter Verlust in der Expression der Zeta-Kette von TILs und PBMCs nachgewiesen (Dworacki *et al.*, 2001). Es gibt allerdings nur wenige Hinweise, dass die Herunterregulation der CD3-zeta-Kette durch den Einfluss des Tumors erfolgt (Taylor *et al.*, 2001). Vielmehr scheint es sich hierbei um die Folge einer erfolglosen Immunantwort, ähnlich einer chronischen Entzündung, zu handeln (Pawelec *et al.*, 1997; Kono *et al.*, 1996).

So genannte KIR-Rezeptoren, die auf NK-Zellen exprimiert werden (KIR - engl.: *Killer inhibitory receptors*), erfüllen eine regulatorische Funktion bei der Eliminierung erkannter Zielzellen (Bakker *et al.*, 1998). Diese Rezeptoren sind spezifisch für bestimmte HLA-Moleküle, deren Bindung die Auslösung eines Aktivierungssignals verhindern oder verstärken kann. Die NK-Rezeptoren werden in zwei Klassen eingeteilt: eine Immunglobulin-ähnliche Klasse, die direkt mit klassischen MHC-I-Molekülen (HLA-A, -B, -C und -G) interagiert und eine Lektin-ähnliche Rezeptorklasse (CD94/NKG2), die an Signal-Sequenzen von MHC-I-bindenden Peptiden, die über HLA-E Moleküle präsentiert werden, bindet (Raulet *et al.*, 2001). Das CD94 Molekül bildet Heterodimere mit Isoformen des NKG2 Moleküls, wobei NKG2A und -B inhibitorische Signale und NKG2C und -E aktivierende

Signale vermitteln (Braud, 1998). Die Expression dieser Rezeptoren ist von großer Bedeutung für die Erkennung von körpereigenen und –nicht-eigenen bzw. veränderten Zellen. So werden die Zellen, die eine „normale“ Anzahl an MHC I Molekülen exprimieren, von den NK-Zellen nicht angegriffen, wohingegen Zellen, die ihre MHC I herunterreguliert haben – wie die meisten Tumorzellen, von NK-Zellen attackiert werden können.

Eine Reihe von NK-Zellrezeptoren wurde vor kurzem auch auf Subpopulationen von T-Zellen identifiziert. Diese Rezeptoren haben die Fähigkeit, die TCR-vermittelte Aktivierung der T-Zellen zu regulieren (Mingari *et al.*, 1998; Soloski, 2001). Sowohl bei NK-Zellen als auch bei T-Zellen haben die inhibitorischen Rezeptoren in ihrer zytoplasmatischen Domäne so genannte ITIM –Motive (engl.: *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), welche nach Bindung des Rezeptors an die entsprechenden MHC-Moleküle phosphoryliert werden. Nachfolgend wird eine zytotoxische Aktivität verhindert. Im Gegensatz dazu haben aktivierende Rezeptoren eine verkürzte zytoplasmatische Domäne, die mit einem ITAM (engl.: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) assoziiert ist und Aktivierung vermittelt. Generell scheint die Affinität der stimulatorischen Rezeptoren zu den entsprechenden MHC I-Molekülen, verglichen mit den inhibitorischen Rezeptoren, geringer zu sein, so dass inhibitorische Signale überwiegen (Raulet *et al.*, 2001).

Die Expression von KIR auf T-Zellen ist ein dynamischer Prozess und wird durch die Einwirkung unterschiedlicher Zytokine beeinflusst. Die Expression von CD94/NKG2A wird durch IL-15 induziert, nicht jedoch die Expression der NK-Rezeptoren aus der IgG-Superfamilie (Mingari *et al.*, 1998). Weiterhin wurde festgestellt, dass inhibitorische Zytokine, wie TGF β und IL-10, die auch von Tumoren produziert werden, ebenfalls die Expression von CD94/NKG2A induzieren können. Im Gegensatz dazu ist die Expression von KIR auf reifen NK-Zellen konstitutiv. Die Induktion dieser Rezeptoren auf T-Zellen scheint auch über die Stimulation des TCR reguliert zu werden. T-Zellen, die häufig Antigen-Kontakt haben, exprimieren KIR, so dass eine Überreaktion verhindert wird (Huard *et al.*, 2000).

Eine Tumor-spezifische CTL, die KIR exprimiert, könnte die entsprechenden Zielzellen, die zusätzlich zum Antigen/MHC-Komplex die protektiven HLA-Moleküle aufweisen, nicht lysieren (Noppen *et al.*, 1998; Mingari *et al.*, 2000). Untersuchungen der KIR-Expression auf Melanom-spezifischen T-Zellen zeigen, dass einige dieser Moleküle von diesen Zellen exprimiert werden (Speiser *et al.*, 1999), jedoch ist die *in vivo* Funktion noch nicht erwiesen.

Die Tumorzellen können auch durch sogenannte „immunologische Ignoranz“ vor der Zerstörung durch reaktive T-Zellen geschützt werden. Regulatorische Moleküle, wie CTLA-4, auf den T-Zellen hemmen die Auslösung eines zytotoxischen Signals nach Bindung des TCR

an den MHC-Peptid-Komplex (Chambers *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass die negative regulatorische Funktion von CTLA-4 besonders bei Autoimmunerkrankungen und Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen von Bedeutung ist und somit eine Rolle in der Protektion körpereigener Zellen erfüllt (Salomon & Bluestone, 2001). Die Immunreaktion auf körpereigene Zellen und somit auch auf Tumorzellen wird auch von regulatorischen T-Zellen wie NKT und CD25⁺/CD4⁺ T-Zellen kontrolliert (Symth *et al.*, 2001).

Allgemein scheint die Entziehung der Melanomzellen aus der Kontrolle des Immunsystems eher auf Eigenschaften der Immunzellen als auf solchen der Melanomzellen zu beruhen. Eine genaue Charakterisierung der Tumor-spezifischen T-Zellen ist daher von großer Bedeutung für die Entwicklung von Immuntherapien beim Melanom.

1.5 Immuntherapien beim malignen Melanom

Das maligne Melanom zeigt nur in einigen Fällen ein Ansprechen auf konventionelle Tumor-Therapien, wie Chemotherapie und Strahlentherapie. Im Gegensatz dazu konnte in vielen Fällen eine spezifische Immunantwort gegen Melanomzellen nachgewiesen werden (Mazzocchi *et al.*, 1994; Romero *et al.*, 1998; Scheibenbogen *et al.*, 2002). Die derzeitigen Immuntherapieansätze setzen eine Antigenität des Tumors voraus und zielen darauf ab, durch direkte oder indirekte Manipulation des Tumors oder des Immunsystems, die Immunogenität des Tumors zu steigern und eine Aktivierung und Expansion von zytotoxischen T-Effektorzellen zu bewirken. Zu den erprobten Immuntherapieansätzen zählen Vakzinationsversuche mit Peptiden, Hybridzellen, DNA, transgenen Vaccinia-Viren oder gentherapeutisch-modifizierten Tumorzellen, sowie systemische oder lokale Interleukingaben (Houghton *et al.*, 2001; Jäger *et al.*, 2002). Obwohl die anti-Tumor-Aktivität der Tumor-spezifischen T-Zellen *in vitro* mehrfach bewiesen wurde, liefern diese Ergebnisse keine direkte Information über die Fähigkeit dieser Zellen, *in vivo* Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. Vereinzelte klinische Erfolge mit Immuntherapien bei Melanompatienten lassen dennoch auf eine Effektivität der Melanom-spezifischen T-Zellen schließen.

Um den Erfolg einer Antigen-Immuntherapie zu gewährleisten, müssen von vornherein bestimmte Kriterien erfüllt werden: 1.) die Antigene, mit denen vakziniert wird, müssen vom Tumor des Patienten präsentiert werden, 2.) der Tumor sollte die entsprechenden MHC-Moleküle, die für die Aktivität der restringierten CTLs benötigt werden, exprimieren und 3.) das T-Zellrepertoire des Patienten sollte in der Lage sein, gegen die in der Vakzine enthaltenen Antigene zu reagieren. Das Auslösen einer spezifischen T-Zell-vermittelten Immunantwort durch Melanom-spezifische Antigene wird nur bei einer optimalen Stimulation der T-Zellen gewährleistet. Wichtige Faktoren für die Aktivierung der CTLs sind:

1. ein kritischer Schwellwert in der Anzahl der TCR-Moleküle, die mit dem Peptid-MHC-Komplex in Kontakt treten, muss überschritten werden, um eine T-Zellantwort auszulösen. Dieser Wert kann verringert werden, wenn eine verstärkte Kostimulation über CD80/86-CD28, CD40-CD40L und/oder CD48-CD2 vorhanden ist.
2. die Menge der exprimierten spezifischen Antigene. Ein Antigenverlust durch Herunterregulation von Molekülen wie MHC Klasse I, Peptid-Transporter TAP oder der Proteasom-Untereinheit LMP, welche Funktionen in der Antigen-Prozessierung und Präsentation erfüllen, verringert oder verhindert eine CTL-Aktivität.
3. Zytokine modulieren die Antigen-Präsentation und die Aktivität der Effektor-Zellpopulation. Beispielsweise fördern IL-2, IL-12, IFN α und IFN γ die Aktivität der CTLs, während IL-10 und TGF β diese verringern.
4. Die CTL-Aktivität kann durch aktive Prozesse, wie die CTLA-4 induzierte Hemmung der T-Zellaktivität durch Blockierung der Zellzyklus-Progression (Hemmung der IL-2-Produktion), beeinträchtigt werden.

Immuntherapien mit Tumor-Antigenen sollten eventuelle Defekte in der T-Zellstimulation aufheben und somit eine gezielte Antwort gegen Tumor-Antigene auslösen. Beim Melanom wurden bis jetzt sowohl aktive als auch passive Immuntherapien durchgeführt. Unspezifische aktive Immuntherapien zielen darauf hin das Immunsystem allgemein zu stimulieren um eventuell somit auch eine Tumor-spezifische Immunantwort zu induzieren. Hierfür wurden sowohl bakterielle Agenzien wie *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), *Corynebakterium parvum* (Agarwala *et al.*, 1998) als auch Immunmediatoren, sogenannte Zytokine (IL-2, TNF α , IFN α , IFN γ) eingesetzt. Obwohl in Studien mit einer Behandlung von Melanompatienten mit IL-2 eine komplette oder partielle Remission des Tumors beobachtet werden konnte, sind diese Erfolge auf eine geringe Anzahl von Patienten begrenzt (Rosenberg *et al.*, 1994; Rosenberg *et al.*, 1998). Eine spezifische aktive Immuntherapie durch Vakzination von Melanompatienten mit bestrahlten autologen oder allogenen Tumorzellen, mit Tumor-Lysat gepulsten dendritischen Zellen oder mit Tumor-spezifischen Antigenen scheint vielversprechender zu sein. Für eine passive Immuntherapie wurden bis jetzt entweder entsprechende monoklonale Antikörper, Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) oder Tumor-infiltrierende T-Zellen eingesetzt. Eine Untersuchung von Rosenberg und Kollegen zeigte bei einer Immuntherapie mit LAK und TIL ein Ansprechrate von 20% bzw. 45% bei den behandelten Melanompatienten (Rosenberg *et al.*, 1990).

Die Induktion einer spezifischen Antwort durch definierte Tumor-Antigene in Kombination mit unterschiedlichen immunstimulierenden Faktoren wird in verschiedenen Therapieansätzen

weltweit versucht. Der Einsatz von melanozytären Differenzierungs-Antigenen scheint, trotz der geringeren vorhergesagten Immunogenität dieser Antigene, gewisse Erfolge zu versprechen. TIL, spezifisch für gp100, Tyrosinase, TRP-1 und TRP-2, die unter Zugabe von IL-2 *in vitro* expandiert wurden, führten nach Reinfusion in den autologen Patienten zur Tumor-Regression (Robbins *et al.*, 1994; Kawakami *et al.*, 1995; Rosenberg *et al.*, 1997). Hiermit wurde gezeigt, dass die Toleranz der spezifischen T-Zellen nach einer *in vitro* Manipulation gebrochen werden kann und, dass diese Zellen *in vivo* die im Tumor exprimierten körpereigene Antigene erkennen und eine Tumor-Regression bewirken. Ein weiterer Beweis für die anti-Tumor-induzierende Reaktion der melanozytären Differenzierungs-Antigene zeigte eine Studie von Rosenberg und White bei auftretender Depigmentierung (Vitiligo) bei Tumorkranken unter Immuntherapie. Nur die Melanompatienten, die mit Tumor-Regression (16%) auf die Therapie ansprachen, entwickelten auch Vitiligo (Rosenberg and White, 1996). Eine Zerstörung des Tumors assoziiert mit der Zerstörung von gesunden Melanozyten zeigt, dass gemeinsame Antigene von spezifischen T-Zellen erkannt werden (Yee *et al.*, 2000). Die Kombination von TIL und IL-2 bei einer Immuntherapie von Melanompatienten führte zu einer höheren Ansprechrate (34%) als die Anwendung der einzelnen Komponenten (Rosenberg *et al.*, 1994). Eine Verstärkung der Immunantwort gegen den Tumor wurde auch bei Patienten beobachtet, die zusätzlich zur Therapie mit HLA-A2-restringierten Peptiden der Antigene Melan A/MART-1, Tyrosinase und gp100, den immunstimulierenden GM-CSF-Faktor bekamen (Jäger *et al.*, 1996). Ein Ansprechen auf eine Immuntherapie zeigten auch Melanompatienten, die ein modifiziertes gp100-Peptid (gp100_{209-217(210M)}) in Kombination mit IL-2 im Vergleich zu Patienten, die nur mit dem Peptid vakziniert wurden (Rosenberg *et al.*, 1998). Eine partielle Tumor-Regression wurde bei 2/12 Melanompatienten, die mit dem Tumor/Testis-Antigen MAGE-3 vakziniert wurden, festgestellt (Marchand *et al.*, 1999). Generell zeigt sich, dass Therapien mit spezifischen antigenen Peptiden in Kombination mit immunstimulierenden Faktoren eine effektivere anti-Tumor Antwort erzeugen als Peptide allein.

Wie schon in Tiermodellen gezeigt wurde, bilden dendritische Zellen (DC), als spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen, optimale zelluläre Adjuvantien für Vakzinationen bei Tumorerkrankungen (Schuler & Steinman, 1997). Erste Erfolge mit Peptid-gepulsten oder Tumor-Lysat-gepulsten dendritischen Zellen bei Melanompatienten zeigte eine klinische Studie von Nestle und Kollegen (Nestle *et al.*, 1998). Fünf von sechzehn, mit dieser Therapie behandelten Patienten, zeigten eine partielle bis komplette Tumor-Regression.

Bis jetzt ist noch nicht eindeutig, welche der vorhandenen Antigene die effektivste anti-Tumor-Antwort vermitteln und wie sie klinisch optimal eingesetzt werden sollten. Jede

Immuntherapie bei Tumoren sollte jedoch Strategien enthalten, die ein Tumor-„escape“ verhindern.

1.6 Immunmonitoring

Für Immuntherapien, die auf eine Expansion von Tumor-spezifischen T-Zellen zielen, ist eine begleitende Analyse der CTL-Funktion und -Frequenz vor und nach Therapie unumgänglich. Das Vorkommen dieser Zellen sollte, wenn möglich in den verschiedenen Kompartimenten wie Tumor, peripherem Blut und Lymphknoten untersucht werden. Nach der Identifizierung der Melanom-assoziierten Antigene ist es zunehmend möglich geworden, die Antigen-spezifischen Zellen mit unterschiedlichen Methoden zu untersuchen.

1.6.1 Limiting Dilution Analyse (LDA)

Für die Frequenzbestimmung von Peptid-spezifischen T-Zellen mit dieser Methode, ist vor der Bestimmung der lytischen Kapazität dieser Zellen, eine 10-14-tägige in vitro Expansion der Zellen notwendig. Die PBMCs (*engl.*: peripheral blood mononuclear cells) werden zusammen mit dem Peptid/Antigen und Stimulatorzellen in Konzentrationen von 0,3-100 Zellen /Kavität in 96-Lochplatten pipettiert. Die Reaktivität der ausgewachsenen Zellklone wird im ⁵¹Chromfreisetzungsversuch untersucht. Somit werden für die Frequenzbestimmung nur die Antigen-spezifischen T-Zellen berücksichtigt, die eine lytische Kapazität besitzen und zusätzlich ein Langzeit-Wachstumspotenzial aufweisen. Antigen-spezifische CTL, die nach der Effektorphase durch eine Antigen-induzierte Apoptose absterben, werden mit LDA nicht detektiert.

Die Frequenzen der Tumor-spezifischen T-Zellen bei unbehandelten Patienten lagen nach Bestimmung mit dieser Methode zwischen 0,003%-0,14% im peripheren Blut und zwischen 0,004%-0,3% in Tumor-befallenen Lymphknoten (Mazocchi *et al.*, 1994). Anichini und Kollegen ermittelten bei unbehandelten Patienten für das Peptid Melan A/MART 1 eine Frequenz von 0,0005%-0,071% an spezifischen T-Zellen (Anichini *et al.*, 1999).

1.6.2 ELISPOT

Der ELISPOT-assay (*engl.*: enzyme-linked immunospot) basiert auf dem Prinzip eines ELISA und wird zur Detektion von aktivierten T-Zellen eingesetzt (Czerkinsky *et al.*, 1988). Über die nach der Aktivierung freigesetzten Zytokine können einzelne reaktive Zellen identifiziert werden. Dafür werden 96-Kavitäten-Microtiterplatten mit Antikörpern, spezifisch für das zu identifizierende Zytokin, beschichtet. Um Antigen-spezifische Zellen zu identifizieren werden PBMCs oder isolierte CD8+-oder CD4+-T-Zellen mit dem entsprechenden Antigen für 6 bis 48 h auf den beschichteten Platten inkubiert. Nach Erkennung des Antigens werden Zytokine, wie IFN γ von den spezifischen T-Zellen freigesetzt und an die zur Beschichtung

eingesetzten Antikörper gebunden. Nach einem Waschgang wird das freigesetzte Zytokin mit Enzym-markierten Antikörpern und einem chromogenem Substrat sichtbar gemacht. Die entstandenen farbigen „spots“ zeigen die einzelnen reaktiven T-Zellen, die mittels Computergesteuerten Analysesystemen quantifiziert werden können. Die ELISPOT-Methode wird in vielen Fällen zur Untersuchung der Frequenz von Antigen-spezifischen Zellen bei Tumorkranken eingesetzt. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Zuordnung der Zytokin-Sekretion zu einer bestimmten Lymphozytenpopulation erst erfolgen kann, wenn die entsprechende Zellpopulation vorher aus dem peripheren Blut isoliert wurde. Eine direkte Charakterisierung der Antigen-spezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut ist hiermit nicht möglich. Ein Vergleich der LDA-Methode mit der ELISPOT-Technik zeigte, dass die mit diesen Methoden gemessenen Werte der Frequenzen Antigen-spezifischer T-Zellen ähnlich sind (Asai *et al.*, 2001).

Reynolds und Kollegen untersuchten mit dieser Methode die Immunantwort bei Peptid-vakzinieren Melanompatienten. Die ermittelten Frequenzen lagen nach der Vakzination für die MAGE-3-spezifischen Zellen zwischen 0,002%-0,01%, für die Melan A/MART 1₂₆₋₃₅-spezifischen T-Zellen zwischen 0,001%-0,002%, für gp100-spezifische Zellen zwischen 0,001%-0,01% und für Tyrosinase-spezifische Zellen zwischen 0,001%-0,004% (Reynolds *et al.*, 1998).

1.6.3 ⁵¹Cr-Freisetzungsversuch

In Chromfreisetzungsversuchen wird die zytotoxische Aktivität von Antigen-spezifischen T-Zellen untersucht. Entsprechende Zielzellen werden mit dem Isotop ⁵¹Cr markiert und danach mit den Antigen-spezifischen T-Zellen für 4-5 Stunden inkubiert. Die Erkennung der spezifischen Antigene führt bei den T-Zellen zur Freisetzung von Perforin und Granzym und damit zur Lyse der Zielzellen. Das von den Zielzellen freigegebene Chrom wird mit entsprechenden Messgeräten quantifiziert. Auch diese Methode wurde in vielen Fällen zur Frequenzbestimmung von Antigen-spezifischen T-Zellen eingesetzt. Für die Identifizierung von spezifischen Zellen aus einer gemischten Kultur oder PBMCs, mit geringer Frequenz an Antigen-spezifischen Zellen, ist die Sensitivität dieser Methode zu niedrig. Für ein positives Ergebnis im Cr-release-assay ist eine Frequenz von 1 zu 1000 erforderlich. In den meisten Fällen ist eine *in vitro* Expansion der Antigen-spezifischen Zellen erforderlich, was zu qualitativen und quantitativen Veränderungen dieser Zellen führen kann (Romero *et al.*, 1998). Zusätzlich wurden bei Melanom reaktive CD8+-T-Zellen beschrieben, die Zytokine wie IFN γ und TNF α freisetzen können aber keine zytotoxische Effektorfunktion haben (Chakraborty *et al.*, 1998).

1.6.4 Tetramere MHC-Moleküle

Eine erst vor kurzer Zeit entwickelte Methode zur Identifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen sind die tetrameren MHC-Moleküle (Altman *et al.*, 1997). Hierfür werden mit unterschiedlichen Systemen lösliche humane MHC-I-Moleküle exprimiert. Je nach Expressionssystem werden die synthetisierten Moleküle entsprechend gereinigt, aufkonzentriert und biotinyliert. Danach werden die Moleküle mit unterschiedlichen Antigen-spezifischen Peptiden beladen und anschließend mit Streptavidin tetramerisiert. Die entstandenen Peptid-spezifischen tetrameren MHC-I-Moleküle können mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert werden und für Analysen am Durchflußzytometer eingesetzt werden. Die Färbung spezifischer T-Zellen mit tetrameren MHC-Peptid-Komplexen beruht auf der Bindung der Tetramere an die entsprechenden T-Zellrezeptoren. Dieses ist eine sehr genaue Methode für eine direkte Quantifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen aus peripherem Blut oder gemischten Zellkulturen. Jedoch können hiermit keine Aussagen über die Funktionalität der Antigen-spezifischen Zellen gemacht werden.

Unter Anwendung von spezifischen tetrameren MHC-I-Molekülen konnten Romero und Kollegen in Tumor-befallenen Lymphknoten Frequenzen von 0,12%-3,7% an Melan A/MART 1₂₆₋₃₅-spezifischen T-Zellen identifizieren. Die mit spezifischen Tetrameren ermittelten Frequenzen der Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈-spezifischen T-Zellen lagen zwischen 0%-0,63% (Romero *et al.*, 1998). Im peripheren Blut von Melanompatienten, die mit dem Peptid gp100₂₀₉₋₂₁₇ in Kombination mit dem Zytokin IL12 vakziniert wurden, wurden nach Vakzination Frequenzen von 0,2%-2,5% für dieses Peptid spezifische T-Zellen identifiziert (Lee K. H. *et al.*, 1999).

1.6.5 Intrazelluläre Zytokinfreisetzung

Die Durchflußzytometrie bietet zusammen mit neuen Techniken für intrazelluläre Zytokinfärbung mehrere Möglichkeiten für eine genaue Charakterisierung von Antigen-spezifischen T-Zellen. T-Zellen, die spezifisch aktiviert werden, produzieren nach Erkennung ihres Antigens Zytokine wie IFN γ , IL-2, IL-4 oder TNF α (Openshaw *et al.*, 1995). Diese Reaktion stellt einen ersten Schritt in der zellulär vermittelten Immunantwort dar. Anhand der Zytokinexpressionsmuster können sowohl unterschiedliche Lymphozyten-Subpopulation identifiziert werden als auch Störungen der normalen T-Zellfunktion festgestellt werden (Elson *et al.*, 1995; Picker *et al.*, 1995). Mittels Durchflußzytometrie können die Antigen-spezifischen T-Zellen auch phänotypisch auf Einzelzellebene charakterisiert werden. Diese Untersuchungen wurden erstmals mit CMV-spezifischen Peptiden bei CMV-seropositiven Patienten durchgeführt (Suni *et al.*, 1998; Kern *et al.*, 1998). Anlehnend an diese Arbeit wurde die Methode für die Untersuchung von Tumor-spezifischen T-Zellen etabliert. Nach 4-6h Stimulation der Vollblutproben oder PBMCs mit Tumorantigenen unter Zugabe des

Sekretionsinhibitors Brefeldin A (BFA) werden die Zellen fixiert, permeabilisiert und intrazellulär mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern gegen die produzierten Zytokine angefärbt. Zusätzlich erfolgt eine Anfärbung der Oberflächenmarker mit T-Zellspezifischen Antikörpern und die durchflußzytometrische Analyse. Dieses ist eine effiziente und zeitsparende Methode für die Identifizierung von reaktiven Antigen-spezifischen T-Zellen.

Mit dieser Methode wurden in Tumor-befallenen Lymphknoten spezifische T-Zellen untersucht (Labarriere *et al.*, 1998). Für das Peptid Melan A/MART 1₂₇₋₃₅ lagen die Frequenzen der CD8+ spezifischen T-Zellen zwischen 0-4,9%. Die Frequenz der T-Zellen spezifisch für die Peptide Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈ und gp100₂₈₀₋₂₈₈ lag bei diesen Untersuchungen zwischen 0-9% bzw. 0-0,7%.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Effektivität neuer Immuntherapien bei Patienten mit malignem Melanom auf zellulärer Ebene und unter Verwendung durchflusszytometrischer Methoden. Die spezifische Immunantwort sollte sowohl im peripheren Blut als auch im Tumor der behandelten Patienten sowie bei einer unbehandelten Kontrollgruppe untersucht werden.

Zur Induktion einer Tumor-spezifischen Immunantwort sollten zwei verschiedene Vakzinationsstrategien angewandt werden:

1. Vakzination der Melanompatienten mit Tumor-spezifischen Peptiden und ubiquitären Helfer-Antigenen (*Recall*-Antigene).
2. Vakzination mit Hybridzellen aus autologen Tumorzellen und allogenen dendritischen Zellen.

In beiden Ansätzen sollte die Frequenz der Tumor-spezifischen zytotoxischen T-Zellen im peripheren Blut vor und nach Therapie untersucht werden. Die Frequenzen an reaktiven Tumor-spezifischen T-Zellen wurden über intrazelluläre Interferon- γ -Färbung nach spezifischer Peptid-Stimulation bestimmt. In ausgesuchten Fällen sollte mittels Färbung mit Peptid-beladenen tetrameren MHC-Molekülen die Frequenz der CTLs, die eine Tumor-Spezifität aufweisen aber keine funktionelle Kapazität besitzen, erfasst werden. Die Multi-Parameter-Durchflusszytometer-Analysen zur Charakterisierung der CTLs sollten Aufschluss über den Phänotyp und den physiologischen Status dieser Zellen geben. Ferner sollten in dieser Arbeit *ex vivo* Analysen zur Bestimmung der Zytotoxizität isolierter Tumor-spezifischer T-Zellen aus peripherem Blut und Tumorgewebe durchgeführt werden.

Die bei diesen Untersuchungen gewonnenen Daten sollten zeigen, mit welcher Häufigkeit spezifische T-Zellen bei Tumor-Patienten nachzuweisen sind, wie sich die Frequenzen von reaktionsfähigen Zellen und Zellen ohne funktionelle Kapazität zueinander verhalten und ob in dieser Hinsicht eine Korrelation mit dem Krankheitsverlauf des Patienten besteht.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Peptide

Alle synthetischen Peptide wurden von Dr. Karl-Heinz Wiesmüller bei EMC Microcollections hergestellt. Die Synthese wurde mit präaktivierten Aminosäuren an fester Phase mittels Fmoc Technik durchgeführt und anschließend per HPLC gereinigt. Die Qualität der Peptide wurde mit Hilfe von HPLC und Massenspektrometrie kontrolliert. Die Peptide wurden in einer Stammlösung von 20 mg/ml in DMSO bei -80°C aufbewahrt. In Tabelle 2 sind die Aminosäure-Sequenzen der verwendeten Peptide aufgeführt.

Tabelle 2: Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten Peptide

HLA-A2 restringiert:

Antigen	Sequenz
MAGE-3 ₂₇₁₋₂₇₈	FLWGPRALV
Melan A/MART-1 ₂₇₋₃₅	AAGIGILTV
Melan A/MART-1 ₂₆₋₃₅	ELAGIGILTV
Tyrosinase ₃₆₆₋₃₇₈	YMNGTMSQV
gp100 ₁₅₄₋₁₆₂	KTWGQYWQV
gp100 ₂₈₀₋₂₈₈	YLEPGPVTA
gp100 ₄₇₆₋₄₈₅	VLYRYGSFSV
gp100 ₄₅₇₋₄₆₆	LLDGTATLRL
gp100 ₂₀₉₋₂₁₇	ITDQVPFSV
CMV pp ₆₅	NLVPMVATV

HLA-A1 restringiert:

Antigen	Sequenz
MAGE-1 ₁₆₁₋₁₆₉	EADPTGHSY
MAGE-3 ₁₆₈₋₁₇₆	EVDOIGHLY

3.1.2 Antikörper

Alle Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 3 unter Angabe ihrer jeweiligen Spezifität, des Klonen und des Fluorochroms aufgelistet.

Tabelle 3: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Spezies	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
CD3	SK7	Maus	IgG1	PerCP	Becton Dickinson
CD3	SK7	Maus	IgG1	APC	Becton Dickinson
CD3zeta	6B10.2	Maus	IgG1	PE	Santa Cruz
CD4	SK3	Maus	IgG1	PerCP	Becton Dickinson
CD8	SK1	Maus	IgG1	PerCP	Becton Dickinson
CD8	SK1	Maus	IgG1	APC	Becton Dickinson
CD16	3G8	Maus	IgG1	PE	Immunotech
CD25	M-A251	Maus	IgG1, k	PE	Pharmingen
CD27	L128	Maus	IgG2a	PE	Becton Dickinson
CD28	CD28.2	Maus	IgG1	PE	Immunotech
CD44	G44-26	Maus	IgG2b	PE	Pharmingen
CD45RA	HI 100	Maus	IgG2b	PE	Pharmingen
CD45RO	UCHL1	Maus	IgG2b	PE	Pharmingen
CD56	B159	Maus	IgG1	PE	Bender System
CD57	NC 1	Maus	IgM	PE	Immunotech
CD69	L78	Maus	IgG1	PE	Becton Dickinson
CD71	YDJ1.2.2	Maus	IgG1	PE	Immunotech
CD94	HP-3D9	Maus	IgG1, k	PE	Pharmingen
CD158a	EB6	Maus	IgG1	PE	Immunotech
CD158b	CH-2	Maus	IgG2b	PE	Becton Dickinson
IFNg	25723.11	Maus	IgG1	PE	Becton Dickinson
IL-2	5344.111	Maus	IgG1	PE	Becton Dickinson
Ki-67	MOPC	Maus	IgG1, k	PE	Becton Dickinson
NKB1	DX9	Maus	IgG1, k	PE	Becton Dickinson
NKAT2	DX27	Maus	IgG2a	PE	Becton Dickinson
Perforin	gG9	Maus	IgG2b	PE	Pharmingen

Isotypkontrollen

Antikörper	Klon	Spezies	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
IgG2a/IgG1	X39/X40	Maus	IgG2a/IgG1	FITC/PE	Becton Dickinson
IgG2b	27-35	Maus	IgG2b	FITC	Pharmingen
IgG1	MOPC	Maus	IgG1	FITC	Pharmingen

Immunhistochemie

Antikörper	Klon	Spezies	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
CD3	AO452	Kaninchen	Polyklonal		DAKO
CD4	MT310	Maus	IgG1		DAKO
CD8	C8/144B	Maus	IgG1		DAKO
S100	Z0311	Kaninchen	Polyklonal		DAKO
gp100	HMB45	Maus	IgG1		DAKO
MAGE-1	clone 77-b	Maus			Uni Basel
MAGE-3	clone 57-b	Maus			Uni Basel
Melan A	A103	Maus	IgG1		DAKO

3.1.3 Patientenmaterialien

Natrium-Heparin Blut (20-40 ml) wurde von Melanompatienten und gesunden Spendern durch venöse Blutentnahme gewonnen. Das Tumormaterial der Melanompatienten wurde unmittelbar nach der Exzision verarbeitet.

3.1.4 Immunkompetenztest

Als Maß für die allgemeine Immunkompetenz der Melanompatienten, die mit synthetischen Peptiden oder Hybridzellen vakziniert wurden, diente die Bestimmung ihres Reaktionsprofils mit Hilfe des Multitest immignost® (Biosyn GmbH, Fellbach). In diesem Test sind 7 *Recall*-Antigene (Mérieux-Antigene) enthalten, die, nach vorangegangenen Impfungen oder häufig auftretenden früheren Expositionen, bei vielen Menschen eine starke sekundäre Immunantwort induzieren. Es handelt sich dabei um Tetanus-Toxoid (550 000 U/ml), Diphtherie-Toxoid ($1,1 \cdot 10^6$ U/ml), Streptokokken-Antigen (2 000 U/ml), Alttuberkulin (300 000 U/ml) Candida-Antigen (2 000 U/ml), Trychophyton-Antigen (150 U/ml), Proteus-Antigen (150 U/ml) und Glycerin als Lösungsmittelkontrolle. Jeder Stempel enthält 30µl der Antigen-Lösung. Hiervon werden typischerweise 1µl beim Stempeltest als intrakutane Injektion in die Haut des Unterarms verabreicht. Eine Rötung der Haut am jeweiligen Stempelkopfabdruck

nach 48 Stunden wurde als positive zellvermittelte Immunität gegen das entsprechende Antigen gedeutet.

3.1.5 Tetramere MHC Komplexe

Tetramere MHC Komplexe, spezifisch für die MART-1/Melan-A Peptide, wurden von Dr. K. Sparbier in der Arbeitsgruppe von Prof. P. Walden hergestellt. Es wurde ein Insektenzellexpressionssystem verwendet, um das humane MHC-I-Molekül HLA-A*0201 zu exprimieren. Insektenzellen sind aus mehreren Gründen für die Expression von MHC-Molekülen geeignet. Die produzierten Moleküle sind peptidfrei, da den Insektenzellen die für die Prozessierung, den Transport von Peptiden und die Beladung von MHCs notwendigen Proteine fehlen. Peptidfreie MHC-Moleküle sind bei 26°C stabil, was der Kultivierungstemperatur für Insektenzellen entspricht.

Als Grundlage für die DNA-Konstrukte wurde ein Insektenzell-spezifischer, kommerziell erhältlicher Expressionsvektor pAc5.1/V5-His (Invitrogen) eingesetzt. Der Vektor enthielt einen konstitutiv-exprimierenden Ac5-Promotor (Actin-Promotor), an den sich direkt die *multiple cloning site* (MCS) anschließt, ein V5 Epitop für den Nachweis des exprimierten Proteins im Immun-Blot, eine Polyhistidin Region, an deren Ende ein Stop-Kodon steht, ein SV40-Polyadenylierungs-Signal und für die Selektion in Bakterien ein Resistenzgen für Ampicillin.

Nach Überprüfung der MHC-Konstrukte mittels DNA-Sequenzierung wurden Insektenzellen (Schneider-2-Zellen) über ein Insektenzell-spezifisches, kationisches Lipid (InsectinPlus, Invitrogen) mit diesen sowie dem Konstrukt für humanes β_2m ohne Biotinylierungssequenz und His-Tag und dem Selektionsvektor phshsneo (McKeown, Salk Institute, San Diego) ko-transfiziert. Nach entsprechender Selektion mit Geneticin, in der Regel für 2 bis 4 Wochen, wurden die Kulturen auf die Expression von MHC-Molekülen untersucht. Hierzu wurden die Kulturüberstände im Immun-Blot mit spezifischen Anti-Seren getestet. Die MHC-exprimierenden Zelllinien wurden expandiert und die Kulturüberstände für die Isolierung löslicher MHCs über mehrere Chromatographieschritte verwendet.

Das mittels Biotin-Ligase (Avidity, L.L.C., Denver) biotinylierte Produkt wurde nach einem weiteren Reinigungsschritt auf einem SDS-Polyacrylamidgel auf Reinheit und auf einem Immun-Blot mit Streptavidin-AP (alkalische Phosphatase) auf spezifische Biotinylierung überprüft. Die biotinylierten MHC-Moleküle wurden mit den HLA-A*0201-restringierten Peptiden der Melan-A/MART-1-Antigene beladen und mittels Streptavidin tetramerisiert. Die tetrameren Moleküle wurden dann an den fluoreszierenden Farbstoff APC (Allophycocyanin)

gekoppelt. Dieses Material wurde in durchflusszytometrischen Analysen zur Färbung der Peptid-spezifischen T-Zellen aus peripherem Blut von Melanompatienten eingesetzt.

3.1.6 Medien, Puffer und Lösungen

Zellkulturmedium 1

RPMI 1640 mit Glutamax (Seromed, Berlin)

FKS 10% (Seromed, Berlin)

Penicillin 50 U/ml, Streptomycin 50 µg/ml, Amphotericin 25 µg/ml (alle GibcoBRL, Karlsruhe)

Zellkulturmedium 2

RPMI 1640 mit Glutamax (Seromed, Berlin)

FKS 10% (Seromed, Berlin)

Penicillin 50 U/ml, Streptomycin 50 µg/ml, Amphotericin 25 µg/ml (alle GibcoBRL, Karlsruhe)

Mercapthoethanol

T-Zellmedium

MEMa mit Glutamax (GibcoBRL, Karlsruhe)

FKS 5% (Seromed, Berlin)

Humanserum 5% (PAN Systems, Passau)

2-Mercaptoethanol (Fluka) 30 µM

Penicillin 50 U/ml (GibcoBRL, Karlsruhe)

Streptomycin 50 µg/ml (GibcoBRL, Karlsruhe)

IL-2 50 U/ml

Enzymmedium

RPMI 1640 (Seromed)

Kollagenase VIII 560 µg/ml (Sigma)

DNase Typ IV 26 µg/ml (Sigma)

PBS

Phosphatgepufferte Saline (10 x) (Seromed, Berlin)

1 : 10 mit aqua dest verdünnt

3.2 Methoden

3.2.1 Immunhistochemische Färbungen

Von in Paraffin eingebetteten Tumorproben wurden 4-6 µm dicke Schnitte angefertigt. Nach Entparaffinierung und Wärmebehandlung wurden die Schnitte mit spezifischen monoklonalen Antikörpern inkubiert. Um die infiltrierenden T-Zellen hinsichtlich ihres Phänotyps zu charakterisieren, wurden die Proben mit anti-CD3 (1:500 verdünnt; Dako, Hamburg), anti-CD4 (1:200 verdünnt, Dako) und anti-CD8 (1:200 verdünnt) für 20 min bei RT inkubiert. Für die Identifizierung der Melanomantigene wurden die Antikörper anti-S100, anti-HMB45, anti-SM5-1, anti-MAGE-1 und anti-MAGE-3 verwendet. Nach dem Waschvorgang erfolgte die Inkubation mit dem Biotin-konjugierten sekundären Antikörper (Dako LSAB-Kit 2) für 10 min. Nach dem zweiten Waschvorgang wurden die Proben mit Streptavidin-Peroxidase und Chromogen als Substrat (Dako AEC Substrate Systems) gefärbt. Die Proben wurden erneut gewaschen und mit Hämalun gegengefärbt.

3.2.2 Zellbiologische Arbeitstechniken

3.2.2.1 Tumorzellisolierung

Die Tumorzellen wurden aus Metastasen der Patienten mit malignem Melanom (Stadium IV) gleich nach der chirurgischen Entfernung isoliert. Nach der Befreiung von Fett- und Bindegewebe wurden die Tumorknoten in 3-6 mm große Stücke geschnitten und nach Zugabe von Enzymmedium 2-3 Stunden bei 37°C in einem Heizrührwasserbad inkubiert. Um größere, unverdaute Gewebestücke von einzelnen Zellen zu trennen, wurde die Zellsuspension durch ein steriles Zellsieb (Maschengröße: 40 µm) gegeben. Die Zellen wurden 3 mal mit PBS bei RT und 400 x g gewaschen. Die isolierten Tumorzellen wurden anschließend in einer Neubauer-Kammer (Neubauer, Marienfeld, Deutschland) gezählt. Die Vitalität wurde mittels Typanblaufärbung bestimmt. Die Zellen wurden entweder gleich zur Vakzineherstellung verwendet oder kryokonserviert und bei -70°C oder -140°C aufbewahrt.

3.2.2.2 Etablierung von Tumorzelllinien

Nach Herstellung der Einzelzellsuspension aus Tumorknoten wurden 1×10^5 - 1×10^6 Zellen in kleine oder mittlere Zellkulturflaschen (Nunc) pipettiert. Es wurden jeweils Ansätze mit Zellkulturmedium 1 bzw. mit Zellkulturmedium 2 angelegt, da sich nach früherer Erfahrung ein unterschiedliches Wachstum der Zellkulturen in den einzelnen Medien zeigte. Die Kulturen wurden 2-3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ bis zur Konfluenz kultiviert. Für die Expansion der Kulturen wurden die adhärenenten Melanomzellen mit PBS gewaschen und zur Ablösung der Zellen mit Trypsin (Seromed, Berlin) 1-2 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen wieder im entsprechenden Medium aufgenommen und erneut bis zur Konfluenz kultiviert.

3.2.2.3 Generierung von dendritischen Zellen

Dendritische Zellen wurden aus Leukapherese-Präparaten gesunder Spender generiert. Die Präparate wurden in der Abteilung Transfusionsmedizin der Charité hergestellt. Bei der Leukapherese werden PBMCs durch Zentrifugation aus dem peripheren Blut isoliert. Durchschnittlich wurden so 7×10^8 - 5×10^9 PBMCs gewonnen. Diese wurden auf 5-6 50 ml Röhrchen (Falcon) verteilt und 4 mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 300 x g; 5 min). Ein fünfter Waschschrift wurde mit Zellkulturmedium 1 durchgeführt. Danach wurden die Zellen gezählt und mit Zellkulturmedium 1 auf eine Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden auf 3-fach Bodenkulturflaschen verteilt (Nunc) und für die Monozytenadhärenz 2,5 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Um die nicht-monozytären nicht-adhären Zellen zu entfernen, wurden die Kulturen 2 mal vorsichtig mit PBS gewaschen. Für die Generierung von dendritischen Zellen aus den adhären Monozyten wurde zu den Kulturen Zellkulturmedium 1, versetzt mit IL-4 (1000 U/ml) und GM-CSF (50 ng/ml), zugegeben. Nach 5 Tagen wurde, um eine Reifung der dendritischen Zellen zu induzieren, das Zytokin TNF- α (500 U/ml) für 1-2 Tage den Kulturen zugefügt. Die reifen dendritischen Zellen wurden für die Herstellung der Hybridzellvakzine verwendet.

3.2.2.4 Generierung der Hybridzellen

Die Hybridzellen wurden für die jeweiligen Patienten aus autologen Tumorzellen und allogenen dendritischen Zellen mittels Elektrofusion generiert (Stuhler & Walden 1994; Trefzer *et al*, 2000). Hierfür wurden die dendritischen Zellen aus den Kulturflaschen geerntet. Sowohl die dendritischen Zellen als auch frisch isolierte oder kryokonservierte Tumorzellen wurden 4 mal mit 5% Glukoselösung mit 2% FCS gewaschen. Die Zellen wurden dann in Glucose (5%) aufgenommen und in einem Verhältnis von 1 Melanomzellen : 1-3 dendritischen Zellen und einer Gesamtzellkonzentration von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml in die Elektrofusionskammern (BioRad) überführt und für 5 Min stehen gelassen. Um ein inhomogenes elektrisches Feld zu erzeugen, wurde vor dem Transfer eine Wand der Elektroporationskammer mit Wachs behandelt. Danach wurden die beiden Zelltypen zuerst für 15 Sek. einem elektrischen Feld (25 V/cm) ausgesetzt, um die Zellen in einer Reihe anzuordnen (alignment). Danach wurden für die Zellfusion drei elektrische Impulse von jeweils 1000 V/cm bei 25 μ F Kapazität angewandt. Die Pulsdauer war jeweils zwischen 1-10 μ s. Anschliessend wurden die Zellen für 5 Min. in den Küvetten stehen gelassen und zusammen mit 0.5 ml Relaxationspuffer (100 mM KCL, 3 mM NaCl, 1.25 mM EDTA, 10 mM

PIPES, 0.5 mM ATP, pH 6.8) in 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Dieselbe Küvetten wurde für maximal eine weitere Fusion des gleichen Patienten benutzt. Für jede weitere Fusion wurde eine neue Küvette benutzt. Post-Fusion wurde die Vitalität der Zellen mittels Trypanblau-Ausschluss bestimmt. Die Zellen wurden danach unmittelbar in den 15 ml Falcon Röhrchen mit 200 Gy bestrahlt und nach Entnahme einer Rückstellreserve von 0.1 ml dem Patienten intrakutan bzw. subkutan injiziert. Das Gesamtvolumen betrug jeweils ca. 2-3 ml und wurde auf 20-30 Injektionsstellen verteilt.

3.2.2.5 Isolierung von Lymphozyten aus Blut

Den Patienten und gesunden Probanden wurden Blutproben (20-40 ml) mit Na-Heparin-versetzten Spritzen entnommen. Die Lymphozyten wurden mit Hilfe eines Ficoll-Dichtegradienten aus dem Blut isoliert. Dazu wurden 2,5 Teile in PBS verdünntes Blut auf 1 Teil Ficoll Paque (Pharmacia, Freiburg) geschichtet und 20 min mit 600 x g bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und 10 min bei 400 x g bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Lymphozyten in 50 ml Zellkulturmedium 1 aufgenommen und nochmals für 10 min bei 400 x g bei RT zentrifugiert.

3.2.2.6 Isolierung von Lymphozyten aus Tumorgewebe

Für die Isolierung von Lymphozyten aus Tumorknoten wurden die Melanommetastasen wie unter (3.2.2.1 Tumorzellisolierung) beschrieben behandelt. Die Einzelzellsuspension aus Tumorzellen und infiltrierenden Lymphozyten wurde in Zellmedium 1 aufgenommen, in eine Zellkulturflasche überführt und 12-20 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach Adhärenz der Melanomzellen wurde der Kulturüberstand mit den nicht-adhärenenten Lymphozyten geerntet, mit PBS gewaschen und bei 400 x g, 10 min bei RT zentrifugiert. Die Lymphozyten wurden dann in T-Zellmedium aufgenommen, in 6-Lochplatten pipettiert und für 5-10 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle 2 Tage wurde Medium aus dem Zellkulturüberstand entnommen und durch frisches T-Zellmedium ersetzt.

Parallel zu diesen Ansätzen wurde ein Teil der Tumorknoten in 2-4 mm große Stücke geschnitten in 6-Flachbodenplatten überführt und mit T-Zellmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach 3-5 Tagen wurden die Tumorstückchen entfernt und die ausgewanderten Lymphozyten unter Zugabe von frischem T-Zellmedium weiter kultiviert.

3.2.2.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -140°C. Zu diesem Zweck wurden sie in 1 ml FCS und 10% DMSO (Serva, Heidelberg) bei einer Dichte von 1×10^6 – 1×10^7 Zellen/ml

aufgenommen und in einer mit Methanol gefüllten Einfrierbox (Nunc) bei -70°C eingefroren. Hierdurch wird ein kontrolliertes Absenken der Temperatur um $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ gewährleistet. Danach wurden die Proben bei -140°C aufbewahrt.

Zur Revitalisierung wurden die Zellen schnell auf 37°C erwärmt, mit Zellkulturmedium 1 in einer Verdünnung von 1:50 versetzt und zentrifugiert ($400 \times g$, 10 min, bei RT). Anschließend konnten sie unter den für sie geeigneten Bedingungen weiter kultiviert werden.

3.2.2.8 Kultur von Standardzelllinien

B-Lymphom-Zelllinien wurden als Zielzellen verwendet, um die Reaktion von T-Zellen auf verschiedene Peptide zu testen. Die T2-Zelllinie hat eine Defizienz im TAP-Transportsystem und präsentiert somit keine zelleigenen MHC-I-Peptide auf ihrer Oberfläche. Da sie eine Deletion im Bereich der MHC-II-Gene aufweist, werden von ihr keine MHC-II-Moleküle exprimiert. Diese Zellen exprimieren leere HLA-A2.1 Moleküle und eignen sich deshalb zur Präsentation von exogenen MHC-I restringierten Peptiden. Die T2-Zelllinie wurde in Zellkulturmedium 1 kultiviert. Die NK-sensitive Zelllinie K562 und die Zelllinie JY wurden in RPMI 1640 mit 7 % FCS kultiviert.

3.2.2.9 Isolierung von antigenspezifischen T-Zellen

Die Melanomantigen-spezifischen T-Zellen wurden aus PBMCs von Hybridzell-vakzinieren Melanompatienten mittels MACS-Technik isoliert. Diese Technik beruht auf der Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die mit paramagnetischen Partikeln gekoppelt sind. Dieser Partikel-Antikörperkomplex ist mit 50 nm im Durchmesser ca. tausendmal kleiner als ein Lymphozyt und bindet an die Antigen-tragenden Zellen. In einem starken Magnetfeld lassen sich dann die an die Partikel gebundenen Zellen von den übrigen Zellen, die das Antigen nicht besitzen, trennen. Verwendet wurde der IFN γ Secretion Assay Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), mit welchem IFN γ produzierende Zellen detektiert werden können. Hierfür wurden $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ isolierte PBMCs in 2 ml RPMI mit 0,1% BSA und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ von den Peptiden Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ oder Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach 1 Stunde wurden 2 ml RPMI mit 20% FCS zugegeben und weitere 3 Stunden inkubiert. Danach wurden die Ansätze gevortext und für 10 min bei $250 \times g$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig gelöst und mit 20 μl Catch Reagent 5 min auf Eis inkubiert. Dieses Reagenz enthält durch Kopplung bispezifische monoklonale Antikörper, die einerseits IFN γ erkennen und andererseits auf der Zelloberfläche an das CD45 Leukozytenantigen binden. Nach Zugabe von 10 ml RPMI mit 10% FCS wurden die Ansätze 45 min bei 37°C und 5% CO_2 geschüttelt. Das nach Peptidstimulation produzierte und aus der Zelle austretende IFN γ wird in diesem Inkubationsschritt an die IFN γ spezifischen mAK von der Zelloberfläche

gebunden. Das nicht gebundene IFN γ wurde in dem darauffolgenden Waschvorgang mit Puffer (PBS mit 0,5% BSA und 2 mM EDTA) und anschließender Zentrifugation (250 x g, 10 min, 4°C) entfernt. Danach wurden die Zellen mit einem sekundären, PE-markierten IFN γ -spezifischen Antikörper für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit einem anti-PE, mit magnetischen Partikeln gekoppelten mAK für 15 min bei 4°C. Der Überschuss an Antikörpern wurde in einem erneuten Waschvorgang entfernt. Das Zellpellet wurde in 500 μ l Puffer aufgenommen und auf die Separationssäule (MiniMACS-Separator) aufgetragen und 3 mal mit je 500 μ l Puffer gespült. Um eine höhere Ausbeute an antigen-spezifischen Zellen zu erlangen, wurde das Eluat erneut auf eine frische Separationssäule aufgetragen. Nach der Entfernung der Separationssäulen aus dem magnetischen Feld wurden die IFN γ sezernierenden Zellen aufgefangen, mit Puffer gewaschen und mit T-Zellmedium bei 37°C und 5% CO $_2$ kultiviert.

3.2.2.10 Generierung von antigenspezifischen T-Zellen

Die antigenspezifischen T-Zellen wurden aus Lymphozytenkulturen generiert. Aus Natrium-Heparinblut der Melanompatienten wurden PBMCs isoliert und in T-Zellmedium aufgenommen. Die Zellen wurden in einer Dichte von $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml in 12-Flachbodenplatten oder 6-Flachbodenplatten pipettiert. Je nach HLA-Typ wurden die entsprechend restringierten Peptide jeweils einzeln in einer Konzentration von 1 μ g/ml zugegeben. In manchen Ansätzen wurde die Hälfte der Zellen für 30 min mit 5 μ g/ml Peptiden inkubiert, danach 2 mal mit PBS gewaschen, in T-Zellmedium aufgenommen und mit 30 Gy bestrahlt. Die bestrahlten und peptidbeladenen Zellen wurden als Stimulatorzellen zu den unbehandelten PBMCs gegeben. Die Kulturen wurden dann bei 37°C und 5% CO $_2$ für 5-7 Tage kultiviert und danach für weitere Untersuchungen verwendet. Alle 10-12 Tage wurden die Kulturen mit peptidbeladenen und bestrahlten Zellen vom jeweiligen Patienten restimuliert.

3.2.3 Chromfreisetzungsversuch

Die zytotoxische Aktivität von Effektorzellen (CTL) wurde über die Freisetzung von 51 Chrom untersucht. Als Zielzellen für die CTLs wurden T2-Zellen, peptidgepulste T2-Zellen, K562-Zellen und eingesetzt. Die CTLs waren entweder isolierte antigen-spezifische T-Zellen, antigen-spezifische T-Zellen aus *bulk* Kulturen oder tumorinfiltrierende T-Zellen. Die Versuche wurden in 96-Rundbodenplatten in Doppelansätzen durchgeführt. Zunächst wurden 5×10^6 Zielzellen in 100 μ l RPMI 1640/20% FCS aufgenommen, mit 100-200 μ l 51 Cr-Natriumchromatlösung (Amersham, Braunschweig; $3,7 \times 10^7$ Bq/ml) versetzt und bei 37°C und 8% CO $_2$ inkubiert. Nach 1 h wurden die Zellen 3 mal mit 1 ml RPMI 1640/10% FCS

gewaschen, in MEMa-Medium mit 0,1% BSA aufgenommen und mit den entsprechenden Melanompeptiden (10 µg/ml) 1 h bei 37°C und 8% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zielzellen 2 mal mit 1 ml RPMI 1640/10% FCS gewaschen und mit einer Neubauer-Kammer die Zellkonzentration bestimmt. Die Zahl der Zielzellen wurde auf 5×10^4 Zellen/ml eingestellt. Pro Ansatz wurden 5×10^3 ⁵¹Cr-markierte Zielzellen in einem Volumen von 100 µl zu einem gleichen Volumen von Effektorzellen zugegeben. Die Effektorzellen wurden vorher in unterschiedlichen Konzentrationen auf die 96-well Platte pipettiert, so dass das Verhältnis der Effektorzellen : Zielzellen von 20 : 1 bis 0,6 : 1 ausreichte. Die Effektorzellen wurden mit den Zielzellen für 5 h bei 37°C und 8% CO₂ inkubiert. Danach wurden 50 µl des Überstandes auf Fest-Szintillator-Platten überführt und die Platten im 50°C-Trockner getrocknet. Die freigesetzte Radioaktivität wurde mit einem Beta-Counter (Packard, Dreieich) gemessen. Als Referenz dienten die spontane und die totale ⁵¹Cr-Freisetzung, im ersten Fall wurden die Zielzellen ohne CTLs, im zweiten Fall mit dem Detergenz Saponin unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{cpm (Versuchsansatz)} - \text{cpm (Spontanfreisetzung)}}{\text{cpm (Totalfreisetzung)} - \text{cpm (Spontanfreisetzung)}} \times 100$$

3.2.4 Durchflusszytometrie

Die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der Lymphozyten wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Mit Hilfe von mAK, an die Fluorochrome gekoppelt sind, kann die Expression und die Dichte von Molekülen auf der Zelloberfläche und in der Zelle untersucht werden. Die Methode ermöglicht die simultane Messung der relativen Zellgröße, der Granularität sowie drei bis vier verschiedener Fluorochrome für mehrere tausend Einzelzellen. Im Durchfluss werden die Zellen über einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm oder 595 nm angeregt und entsprechend der physikalischen Eigenschaften und der Fluoreszenzmarkierung kommt es zur Streuung des Lichtes und zur Fluoreszenzlichtemission durch die Fluorochrome. Das gestreute und emittierte Licht wird durch Photodetektoren erfasst. Von den Streueigenschaften der Zelle wurden das Vorwärtstreulicht (forward scatter FSC), das ein Maß für die Größe der Zelle darstellt, und das 90°-Streulicht, das ein Maß für die Granularität darstellt, gemessen. Die Emission der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe wurde in 90°-Richtung aufgenommen. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC emittiert bei 525/50 nm (FL 1), PE bei 575/25 nm (FL 2), PerCP (FL 3) bei 680/30 nm und APC bei 660/40 nm (FL 4). Die Analysen erfolgten jeweils an einem FACScan™ (Becton Dickinson, Heidelberg) oder im Fall von 4-Farbmessungen an

einem FACS-Calibur™ (Becton Dickinson) mit der Software CellQuest™ (Becton Dickinson). Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Abhängig von der Fragestellung wurden verschiedene Protokolle verwendet.

3.2.4.1 Phänotypische Analyse von Oberflächenmolekülen

Für die Analyse von Oberflächenmolekülen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in PBS mit 0,1% BSA und 0,01% NaN₃ (Fluka, Deisenhofen) aufgenommen. Für jeden Ansatz wurden 5 – 10 x 10⁵ Zellen mit bis zu 4 verschiedenen Fluorochrom-markierten mAK (1 - 2 µg/ml) in einem Volumen von 50 µl für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 mal mit PBS/0,1 % BSA/0,01 % NaN₃ gewaschen, in 200 µl der gleichen Lösung aufgenommen und anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

3.2.4.2 Phänotypische Analysen von intrazellulären Molekülen

Die Analyse von intrazellulären Molekülen erfordert, dass die Zellen fixiert und permeabilisiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen 10 min bei RT im Dunkeln mit FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson, Heidelberg) inkubiert. Dies ist ein hypotoner Puffer, der auch für die Lyse von Erythrozyten verwendet wurde und Paraformaldehyd (PFA) für die Zellfixierung enthält. Nach einem Waschschrift mit PBS/0,1% BSA/0,1% NaN₃ erfolgte die Inkubation mit FACS™ Permeabilization Solution (Becton Dickinson, Heidelberg) für 10 min bei RT im Dunkeln. Dieser Puffer enthält ebenfalls PFA, zusätzlich aber das Detergenz Saponin, wodurch die Zellmembranen permeabilisiert werden. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/0,1% BSA/0,1% NaN₃ gewaschen und 30 min mit den entsprechenden mAK bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Ansätze wurden nach dem Waschschrift entweder sofort, oder nach 12-24 h in Durchflusszytometer analysiert.

3.2.4.3 Funktionelle Analyse von Lymphozyten

Die funktionelle Analyse von Lymphozyten aus peripheren Blut zur Bestimmung der Frequenzen von antigen-spezifischen T-Zellen erfolgte anhand der intrazellulären IFN γ Produktion nach Antigenstimulation (Kern et al., 1998). Die Frequenz der antigen-spezifischen T-Zellen wurde entweder direkt im Vollblut, in isolierten PBMCs oder in isolierten TILs bestimmt. Die Blutproben wurden von Melanompatienten vor der Vakzinierung sowie 1 und 2 Tage nach der Vakzinierung entnommen. Für die Frequenzbestimmungen im Vollblut wurden 500 µl Blut pro Ansatz mit jeweils 10 µg/ml der entsprechenden HLA-restringierten Peptide für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Bei den Ansätzen mit isolierten PBMCs und TILs wurden die Zellen (2-3 x 10⁶) jeweils in 500 µl RPMI 1640 und 0,1% BSA aufgenommen, mit Peptiden versetzt (10 µg/ml) und in schräger Lage (5° Winkel) unter den üblichen Kulturbedingungen inkubiert. Nach 1,5 h wurden zu den Vollblutproben 10 µg/ml

Brefeldin A (BFA; Sigma) gegeben und die Inkubation fortgesetzt. Zu den Ansätzen mit PBMCs wurden nach 1 h 500 µl RPMI 1640 mit 20% FCS und 10 µg/ml BFA hinzugefügt und die Inkubation fortgesetzt. BFA inhibiert den Vesikel-Transport vom ER zum Golgi-Apparat (Misumi *et al.*, 1986), dadurch kommt es zur Akkumulation von Proteinen in der Zelle. Nach 5 h wurde zu allen Ansätzen EDTA (2 mM) pipettiert, gevortext und für 10 – 15 min unter den üblichen Kulturbedingungen inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde nochmals gevortext, mit PBS gewaschen und wie (in 3.2.4.2 *Phänotypische Analysen von intrazellulären Molekülen*) beschrieben mit FACS™ Lysing und FACS™ Permeabilization Solution inkubiert. Danach erfolgte die Färbung mit den spezifischen Antikörpern für 30 min bei RT und Dunkelheit.

Als Referenzen wurden Ansätze ohne Peptide und Ansätze mit Kontrollpeptiden verwendet. Als Kontrollpeptide für die HLA-A1⁺ positiven Patienten wurden das HLA-A2-restringierte Peptid MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ und das CMV Peptid CMVpp₆₅ eingesetzt. Für die HLA-A2⁺ Patienten wurden das HLA-A1-restringierte Peptid MAGE-3 und CMVpp₆₅ verwendet. Für die Positivkontrollen wurden die Zellen mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) stimuliert und wie oben beschrieben behandelt. Anstelle von Tumor-spezifischen Peptiden wurden in einigen Fällen zur Stimulation auch Tumorzellen des jeweiligen Patienten oder als Kontrollen allogene Tumorzellen eingesetzt.

Für die Frequenzanalyse von Tumor-spezifischen CD8⁺-Zellen wurde folgende Antikörperkombination verwendet: anti-CD3-APC, anti-CD8-PerCP, anti-CD69-PE, und anti-IFN γ -FITC (genauere Angaben siehe Tabelle 3). Für eine detaillierte Charakterisierung der IFN γ -produzierenden Lymphozytenpopulation wurden anstelle von anti-CD69-PE alle anderen in Tabelle 3 angegebenen PE-gekoppelten Antikörper verwendet. Zur phänotypischen Analyse wurden in einigen Fällen anstelle des anti-CD3-APC Antikörpers peptidspezifische tetramere MHC-Moleküle eingesetzt. Pro Ansatz wurden bis zu 1 x 10⁶ Zellen im Durchflussszytometer analysiert.

3.2.4.4 Tetramer-Färbung

Für die Identifizierung der Peptid-spezifischen T-Zellen, die durch eventuelle Funktionsstörungen auf eine Stimulation mit den eingesetzten Peptiden nicht reagieren können, wurden tetramere MHC-I-Moleküle verwendet. Diese Moleküle, beladen mit den Peptiden Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ oder Melan A/MART 1₂₇₋₃₅, wurden für die durchflussszytometrischen Analysen in der vierten Fluoreszenz eingesetzt. Bei der Optimierung der Tetramer-Färbung zeigte sich, dass diese, wenn bereits vor der Stimulation der Zellen oder erst nach Permeabilisation der Zellen durchgeführt, durch eine nur schwache Bindung der Tetramere an den TCR beeinträchtigt wurde. Die Färbung mit den tetrameren

MHC-Molekülen erfolgte daher unmittelbar nach Stimulation der PBMCs mit den entsprechenden Peptiden. Nach 5,5 h Inkubation mit den Peptiden und nachfolgender EDTA-Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, zentrifugiert und mit tetrameren MHC.-Molekülen für 30 min auf Eis und bei Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Waschpuffer gewaschen und in den nachfolgenden Schritten für die intrazelluläre IFN γ -Färbung wie oben beschrieben behandelt.

3.2.4.5 Bestimmung der T-Helferzell-Aktivität

Nach Induktion einer zellvermittelten Immunität durch Injektion der *Recall*-Antigene (siehe auch 3.1.4 Immunkompetenztest) wurde die CD4⁺-T-Zellantwort auf diese Antigene im Blut untersucht. Hierfür wurden 500 μ l Vollblut mit 5 μ l Antigen aus dem Stempelkopf für 1,5 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die optimale Antigenkonzentration wurde vorher in einer Verdünnungsreihe bestimmt. Nach dieser Inkubation wurden den Proben 10 μ g/ml BFA zugegeben und weitere 4 h inkubiert. Danach wurde die intrazelluläre Färbung wie unter 3.2.4.2 *Phänotypische Analysen von intrazellulären Molekülen* beschrieben, durchgeführt. Die antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen wurden mit folgenden Antikörperkombinationen gefärbt: anti-CD4-PerCP, anti-CD69-PE, anti-IFN γ -FITC oder anti-CD4-PerCP, anti-IFN γ -PE oder anti-IL-2-PE oder anti-IL-4-PE und anti-CD3-FITC.

3.2.4.6 Auswertung der Fluoreszenzen

Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde die Software CellQuest™ (Becton Dickinson) verwendet. Die erhaltenen Informationen wurden in Form eines Punktdiagramms (*dot plot*) dargestellt (Abbildung 2). Die interessierende Leukozytenpopulation wurde nach sequentieller Eingrenzung identifiziert. Als erstes wurde die Lymphozytenpopulation in der Parameterkombination Vorwärtsstreulicht (=Größe) gegen Seitwärtsstreulicht (=Granularität) eingegrenzt (Abbildung 2, gekennzeichnet als Region 1, R1). Das Streulichtdiagramm ist unabhängig von der Antikörperbindung an Oberflächenantigene von Zellen, für jede Markierung konstant und kann daher zum Erkennen und zum Eingrenzen der einzelnen Zellpopulationen verwendet werden.

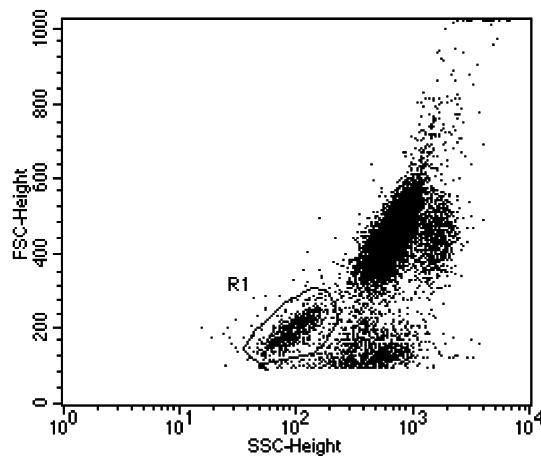


Abbildung 2: Lymphozytenpopulation (R1) im Streulichtdiagramm. Oberhalb dieser Population sind die Monozyten und Granulozyten zu erkennen.

Die Lymphozytensubpopulationen wurden anhand der spezifischen Markierung mit den mAK identifiziert. Hierfür wurde die Lymphozytenpopulation aus R1 im Seitwärtsstreulicht gegen den CD8-Marker aufgetragen (Abbildung 3). Die CD8⁺-Population wurde eingegrenzt und im nächsten Auswertefenster die Fluoreszenzeigenschaften dieser Population in FL1 und FL2 dargestellt.

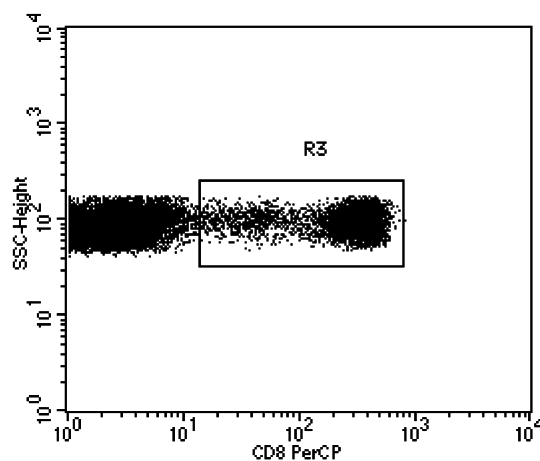


Abbildung 3: CD8⁺ Population im Seitwärtsstreulicht. Die CD8 hoch exprimierende und intermediär exprimierende Population wurden für die Berechnung der Frequenz IFN γ -produzierender Zellen in der 3-Farben FACS-Analyse miteinbezogen

Bei der 4-Farbenanalyse wurde nach der Eingrenzung der Lymphozytenpopulation die Population der CD8⁺ T-Zellen in FL3 und FL4 dargestellt (Abbildung 4).

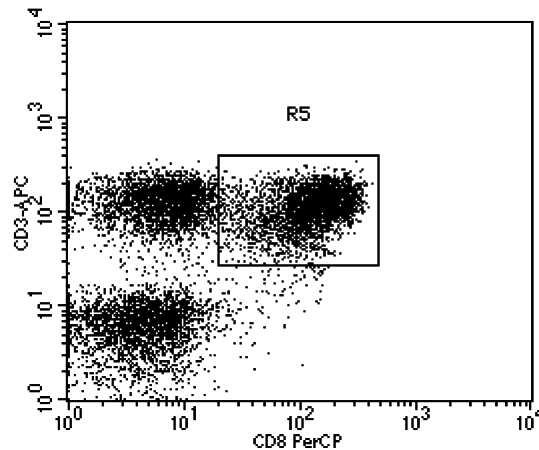


Abbildung 4: Charakterisierung der Lymphozytenpopulation mit dem anti-CD8 mAK in FL3 und anti-CD3 mAK in FL4. Die CD8/CD3 doppelt positiven Lymphozyten wurden für die Berechnung der Frequenz IFN γ -produzierender Zellen in der 4-Farben FACS-Analyse miteinbezogen

Die im Seitwärtsstreulicht positiven CD8-Zellen oder die doppelt positiven CD3⁺/CD8⁺ Zellen wurden dann auf die Expression der Aktivierungsmarker CD69 in FL2 und IFN γ in FL1 untersucht (Abbildung 5).

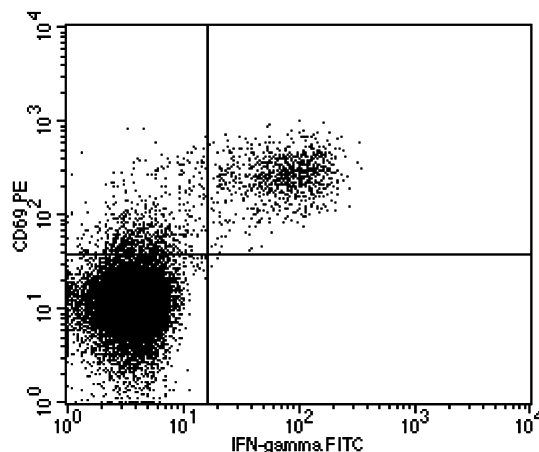


Abbildung 5: Charakterisierung der CD8⁺-T-Zellpopulation nach Peptidstimulation mit den Aktivierungsmarkern CD69 in FL2 und IFN γ in FL1. Die doppelt positive Zellpopulation im oberen rechten Quadranten wurde für die Frequenzbestimmung dieser Zellen im peripheren Blut und Tumor verwendet.

Der Anteil der CD8⁺ T-Zellen, die nach Aktivierung sowohl CD69 exprimieren als auch IFN γ produzieren, wurde mit dem Statistikprogramm der CellQuest™ Software (Becton Dickinson, Heidelberg) berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Peptid-Vakzination

4.1.1 Strategie

Die Erkennung von MHC-I-restringierten Peptiden des Tumors erfolgt über spezifische CD8⁺-zytotoxische T-Lymphozyten. Zur optimalen Aktivierung dieser Zellen wird die Hilfe von MHC-II-restringierten CD4⁺ T-Helferzellen benötigt. Um eine allgemeine Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen zu induzieren, wurden in dieser klinischen Studie Melanom-assoziierte Peptide zusammen mit sogenannten *Recall*-Antigenen für die Immuntherapie von Melanompatienten eingesetzt. Spezifische CD8⁺ T-Zellen reagieren MHC-I-restringiert auf die präsentierten Tumorpeptide, während die CD4⁺ T-Zellen auf die über MHC-II präsentierten *Recall*-Antigene reagieren. Die natürlich vorkommenden Antigene (Merieux-Antigene oder *Recall*-Antigene) aus dem Multitest immignost® (Biosyn GmbH, Fellbach) führen bei einem Großteil der Bevölkerung zu Th1-Reaktionen. Die für diese Antigene spezifischen CD4⁺ memory-T-Zellen werden nach dem Kontakt mit den über APCs präsentierten *Recall*-Antigenen reaktiviert und zur Produktion von IL-2 angeregt. Durch dieses Zytokin wird die Proliferation der auf die Melanompeptide spezifisch reagierenden CD8⁺ T-Zellen angeregt. Zu den eingesetzten *Recall*-Antigenen gehören das Tetanus-Toxoid, Diphtherie-Toxoid, Streptokokken-Antigen, Alt-Tuberkulin, Candida-Antigen, Trychophyton und Proteus in Glycerin als Lösungsmittel. Nach zurückliegenden Impfungen oder anderweitigen früheren Expositionen induzieren diese Antigene eine starke sekundäre Immunantwort und eignen sich daher als Th-Antigene zur Unterstützung einer Tumorspezifischen Peptid-Vakzinationen. Die Reaktion der Patienten auf die einzelnen *Recall*-Antigene wurde vor der Therapie mit einem Stempeltest untersucht. Nur diejenigen Patienten, die noch mindestens auf eines der *Recall*-Antigene eine Reaktion zeigten, wurden in die Studie einbezogen. Hiermit wurde sichergestellt, dass im Gegensatz zu anderen Immunisierungsstrategien, wie z.B. mit KLH als Helferantigen, hier schon Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen vorhanden sind und das Immunsystem des Tumorpatienten noch in der Lage ist, eine Th-Antwort zu generieren. Diese Therapie eignete sich zur Induktion einer spezifischen Immunantwort bei Melanompatienten mit wenig Tumormasse oder inoperablem Tumor. Die Effektivität der Induktion von *Recall*-Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen und der Tumor-Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung nach Peptid-Stimulation im Durchflusszytometer untersucht.

4.1.2 Patienten

An der Studie nahmen vier Melanompatienten im Krankheitsstadium IV teil. Zwei von ihnen erhielten vor der Behandlung eine Chemotherapie. Bezüglich des HLA-Typus waren zwei der Patienten HLA-A1⁺ und zwei HLA-A2⁺. Generell wurde zu Beginn ein Immunkompetenz-Test mit den *Recall*-Antigenen durchgeführt. Das Reaktionsprofil des Immunsystems gegenüber den getesteten Antigenen gibt Aufschluss über die allgemeine Immunkompetenz der Patienten und ermöglicht es, die geeigneten Th-Antigene zu ermitteln. Es handelt sich um einen Stempeltest, der intradermal auf die Haut des Unterarms appliziert wird. Sofern die Patienten auf die jeweiligen Antigene reagierten, kam es infolge der Infiltration von reaktiven Zellen zu einer Rötung und einer Induration an der Injektionsstelle. Nach 48 h wurde der Test ausgewertet und Rötungen sowie Induration größer als 2 mm als positive Reaktion gewertet.

4.1.3 Therapie

Die Immunisierung der Patienten mit den Peptiden und den als positiv identifizierten *Recall*-Antigenen erfolgte intradermal in Regionen mit intakten Lymphknoten am Oberschenkel, Bauch und Arm. Die Vakzination wurde alle vier Wochen wiederholt.

Die HLA-A1⁺ Patienten HKR und ARU erhielten jeweils 200 µg der Peptide MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉ und MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ (Peptidsequenz siehe Tabelle 1), die vorher mit den positiv identifizierten *Recall*-Antigenen vermischt wurden. Bei Patient HKR waren dies Tetanus-Toxoid (16500 IU), Diphtherie-Toxoid (33000 IU), inaktiviertes Streptokokken-Antigen (60 IU), Alttuberkulin (900 IU) und inaktiviertes Proteus-Antigen (45 IU). Das Gesamtvolumen betrug 100 µl. Diese Vakzine wurde 8 mal verabreicht. Patient ARU zeigte eine positive Reaktion auf Tetanus-Toxoid und inaktiviertes Candida-Antigen. Eine dementsprechende Vakzine wurde 4 mal appliziert.

Die HLA-A2⁺ Patienten HIG und KBI zeigten beide eine positive Reaktion auf Alttuberkulin und inaktiviertes Proteus-Antigen. Die Vakzine enthielt diese Antigene und jeweils 200 µg der Peptide MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈, MART-1/Melan A₂₆₋₃₅, MART-1/Melan A₂₇₋₃₅, Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈, gp100₁₅₄₋₁₆₂, gp100₂₈₀₋₂₈₈, gp100₄₇₆₋₄₈₅, gp100₄₅₇₋₄₆₆ und gp100₂₀₉₋₂₁₇ (Peptidsequenz siehe Tabelle 1). Patient HIG wurde 8 mal und Patient KBI wurde 3 mal mit den entsprechenden Vakzinen geimpft.

Die allgemeine Reaktion auf die Immuntherapie wurde vier Wochen nach der 3. Vakzination mittels klinischer Untersuchungen wie CT und Ultraschall evaluiert. Ein klinisches Ansprechen wurde als komplette Remission (CR) bei einem vollständigen Rückgang des

Tumors, als partielle Remission bei mehr als 50% Rückgang und als stabile Erkrankung bei Progression bis 25% oder Rückgang bis 50% der Tumormasse definiert. Die Behandlung wurde von allen Patienten gut vertragen, es gab keine nennenswerten Nebenwirkungen, außer lokaler Reaktionen an der Injektionsstelle und in manchen Fällen erhöhte Temperatur.

4.1.4 Klinisches Ansprechen

Es wurde bei keinem Patienten eine deutliche Tumorremission beobachtet. Nennenswert ist, dass es bei einem der vier Patienten zu einem Wachstumsstillstand des Tumors kam, wie durch die CT-Untersuchung gezeigt werden konnte. Nach einer Hochdosis-Chemoimmuntherapie zeigte Patient ARU eine Progression von bekannten Lebermetastasen. Nach drei Zyklen Peptidvakzinierung wurde eine Stabilisierung der Lebermetastasen (SD) festgestellt. Bei Patient HIG wurden Lebermetastasen und Nierenmetastase eines Aderhautmelanoms diagnostiziert. Nach drei Zyklen Peptidvakzinierung erfolgte eine progrediente Lebermetastasierung. Bei Patient HKR wurden Leber- und Lungenmetastasen festgestellt. Dieser Patient zeigte eine Progredienz unter drei verschiedenen Chemotherapien. Nach drei Zyklen Peptidvakzinierung erfolgte eine progrediente Metastasierung der vorhandenen Metastasen. Bei Patient KBI wurden Lebermetastasen und cerebrale Melanommetastasen diagnostiziert. Nach drei Zyklen Peptidvakzinierung wurde eine progrediente Lebermetastasierung festgestellt.

4.1.5 Immunhistologie

Die Tumorpräparate (Paraffinschnitte) der o.g. Patienten wurden immunhistologisch auf das Vorhandensein von Tumorantigenen und T-Zellinfiltraten untersucht. Als Tumormarker wurden spezifische mAK gegen die Tumorantigene Tyrosinase, gp100, Melan A/MART 1, MAGE 1 und MAGE 3 eingesetzt. Die infiltrierenden T-Zellen wurden mittels mAK gegen die Oberflächenmoleküle CD3, CD4 und CD8 charakterisiert. Die Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Immunhistologische Untersuchungen von Melanommetastasen der mit Peptid-Vakzine behandelten Patienten mittels mAK gegen Tumormarker (Tyrosinase, gp100, Melan A/MART 1, MAGE 1/3) und mAK gegen T-Zellmarker (CD3, CD8, CD4). Quantifizierung: +++, 80-100% der Zellen positiv; ++, 50-80% der Zellen positiv; +, 20-50% der Zellen positiv; (+), 5-20% der Zellen positiv; -, 0-5% der Zellen positiv.

HLA-A*01 Patienten	CD3	CD8	CD4	Tyrosinase	gp100	Melan A/ MART 1	MAGE-1/ MAGE-3
HKR	++	(+)	-	-	-	+	+
ARU	(+)	-	-	-	(+)	(+)	+

HLA-A*0201 Patienten	CD3	CD8	CD4	Tyrosinase	gp100	Melan A/ MART 1	MAGE-1/ MAGE-3
HIG	-	-	-	-	++	++	- / -
KBI	kein Tumormaterial verfügbar						

Bei Patient HKR zeigten die Tumorzellen immunhistologisch nur eine geringe Anfärbung (5%) für die eingesetzten Tumormarker. Die infiltrierenden T-Zellen in dieser Probe exprimierten das CD3 Molekül, jedoch nur in geringem Maße CD8. Es wurden keine CD4⁺ T-Zellen detektiert. Bei Patient ARU waren die Tumorzellen ebenfalls nur schwach positiv für die Tumorantigene. Es wurde nur eine geringe Anzahl (5%) von CD3⁺ T-Zellen im Tumormaterial identifiziert.

Der Patient HIG zeigte im Tumor eine höhere Expression der Tumorantigene. 70% der Tumorzellen exprimierten bei diesem Patienten die Antigene gp100 und Melan A/MART 1. Hinsichtlich des T-Zellinfiltrats war der Tumor dieses Patienten negativ. Von Patient KBI war kein Tumormaterial für histologische Untersuchungen verfügbar.

Die Biopsien, die 24 h oder 48 h nach der Injektion aus der Injektionsstelle entnommen wurden, zeigten ein starkes CD4⁺-Infiltrat und weniger infiltrierende CD8⁺-Zellen. Ein Beispiel ist für Patient HKR in (Abbildung 3, Anhang) gezeigt.

4.1.6 Induktion von Recall-Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen

Vor der Vakzination, sowie 24 h und 48 h danach wurden die Frequenzen der *Recall*-Antigen spezifischen CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Die Evaluation der Frequenz dieser Zellen sollte

Aufschluss über die Induktion einer Th-Antwort geben. Patient HIG zeigte eine intensive Hautreaktion gegen Proteus-Antigen und Tuberkulin. Im peripheren Blut konnten *in vitro*, nach Stimulation mit diesen Antigenen, mittels intrazellulärer Zytokinfärbung Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen identifiziert werden. Im Vakzinationszyklus 1 und 2 wurden keine Messungen der *Recall*-Antigen-spezifischen T-Zellen durchgeführt. Ein signifikanter Anstieg der Tuberkulin-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zeigte sich nach der 3. Vakzination, von 0,23% vor der Vakzination auf 0,42% zum Zeitpunkt 48 h nach der Vakzination. Während der 4. Vakzination zeigte sich innerhalb von 24h ein Anstieg der Proteus-spezifischen CD4⁺ T-Zellen von 0,07% auf 0,51% mit einem Rückgang auf 0,02% nach 48 h (Abbildung 6). Die Anzahl der Tuberkulin-spezifischen CD4⁺ T-Zellen stieg mit 0,32% nach dieser Vakzination nur geringfügig an (Abbildung 7). Bei den anschließenden Vakzinationen ergab sich ein ähnliches Bild. Sowohl die unstimulierten als auch die mit Kontroll-Antigen (Trychophyton) stimulierten Zellen zeigten keine IFN γ -Produktion. Parallel zu der intrazellulären IFN γ -Messung wurden die Zellen auf IL-2-, IL-4-, und IL-10-Produktion untersucht. Das Zytokinmuster der mit den *Recall*-Antigenen stimulierten T-Zellen war Th1-spezifisch. Die IFN γ -produzierenden Zellen exprimierten zusätzlich IL-2, aber kein IL-4 und IL-10. Bei Patient HKR und Patient KBI konnte die Bestimmung der *Recall*-Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut nicht durchgeführt werden. Patient ARU zeigte eine positive Reaktion auf Tetanus-Toxoid und inaktiviertes Candida-Antigen. Im peripheren Blut konnten jedoch keine spezifischen T-Zellen für diese Antigene detektiert werden.

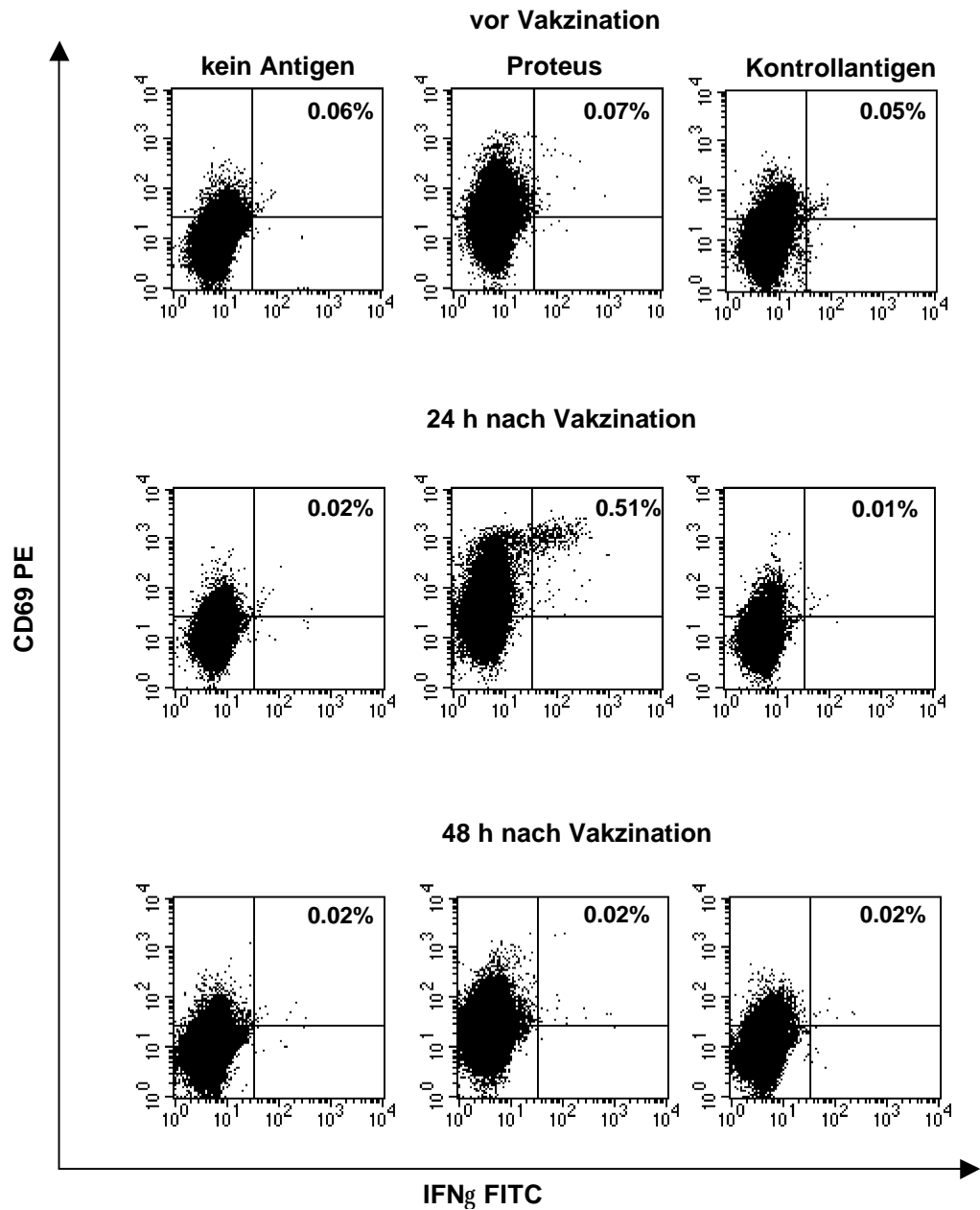


Abbildung 6: Frequenzen der Proteus-spezifischen CD4⁺/CD69⁺, IFN γ -produzierenden T-Zellen im peripheren Blut des Patienten HIG. Die Frequenzen wurden mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung, nach 5,5-stündiger Antigen-Stimulation und unter Zugabe von BFA ermittelt.

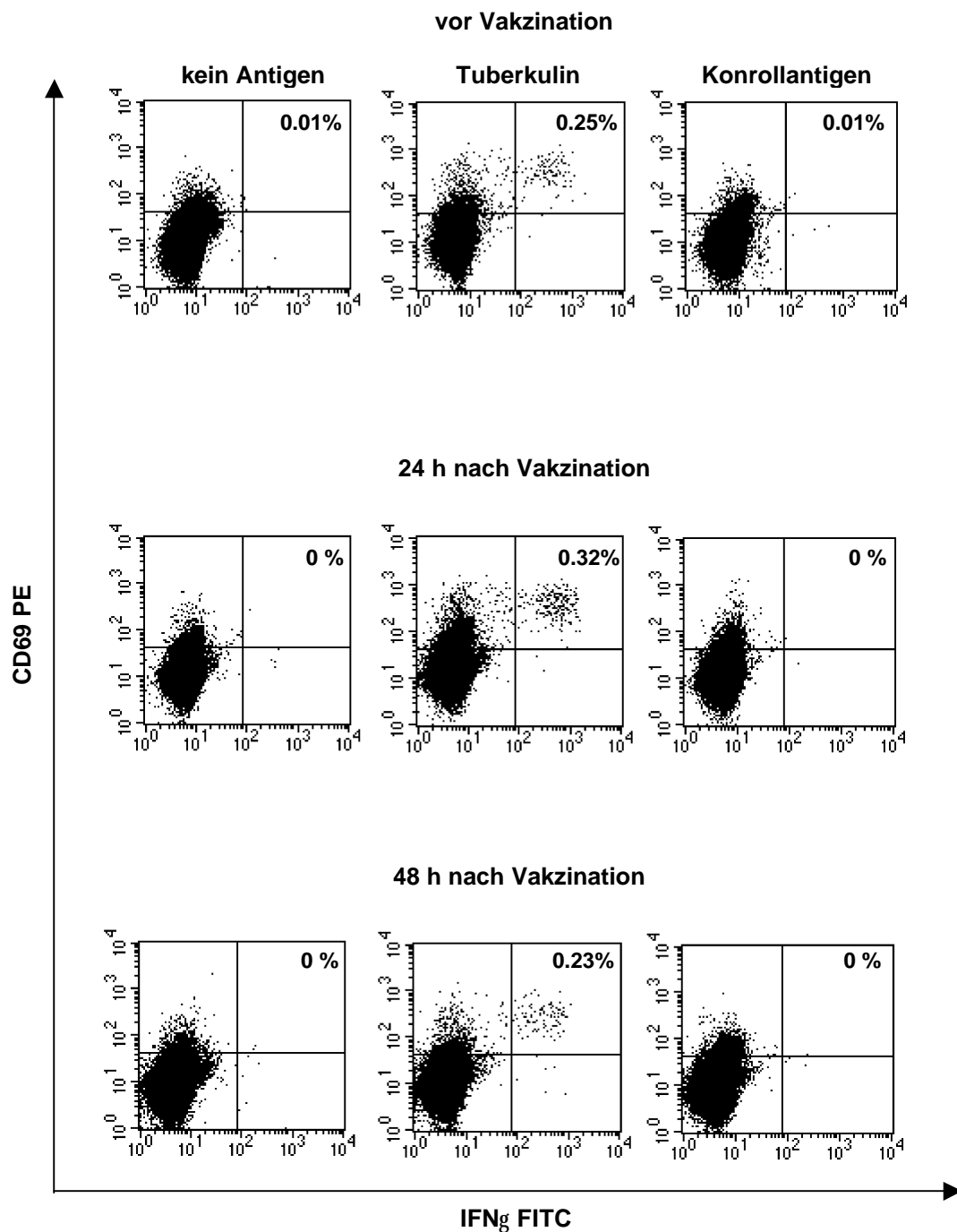


Abbildung 7: Frequenzen der Tuberkulin-spezifischen CD4⁺/CD69⁺, IFN γ -produzierenden T-Zellen im peripheren Blut des Patienten HIG. Die Frequenzen wurden mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung, nach 5,5-stündiger Antigen-Stimulation und unter Zugabe von BFA ermittelt.

4.1.7 Frequenzanalysen von Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen unter Therapie

Die Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut wurden über die intrazelluläre IFN γ -Produktion dieser Zellen vor der Vakzination (0 h) sowie 24 h und 48 h nach der Vakzination bestimmt. In einigen Fällen wurde die Frequenzbestimmung auch nach sieben Tagen durchgeführt. Zu der aktivierten T-Zellpopulation wurden diejenigen CD8⁺ T-Zellen gerechnet, die mittels IFN γ -Produktion und CD69-Expression auf die Stimulation reagierten. Die Werte sind als Prozentsatz der CD8⁺/CD69⁺/IFN γ ⁺ Zellen von der gesamten CD8⁺ Population angegeben. Von diesen Werten wurde jeweils der Anteil an Zellen abgezogen, der bei der entsprechenden unstimulierten Probe gemessen wurden (Hintergrund). Generell wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz durchflusszytometrisch untersucht, so dass auch geringe Frequenzunterschiede eine statistische Relevanz hatten.

4.1.7.1 Frequenzanalysen bei HLA-A1⁺ Patienten

Die Abbildung 8 fasst die Frequenzen der MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉ und MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ spezifischen CD8⁺ T-Zellen der HLA-A1⁺ Patienten HKR und ARU zusammen. Bei Patient HKR wurden die Frequenzen über 5 Vakzinationszyklen bestimmt. Die Frequenzen der MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉ spezifischen CD8⁺ T-Zellen lagen hier vor der 1. Vakzination bei 0,1% und stiegen 48 h nach der Vakzination auf 0,15% an. Bei dieser Vakzination stiegen die MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach 48 h von 0,04% auf 0,09% an. Vor dem 2. Vakzinationszyklus konnten keine MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉ spezifischen CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden. Zum Zeitpunkt 24 h und 48 h nach der 2. Vakzination konnten diese Zellen mit 0,03% bzw. 0,02% im peripheren Blut wieder gemessen werden. Eine Frequenz von 0,07% wurde bei den MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ spezifischen CD8⁺ T-Zellen vor der Vakzination gemessen. Dieser Wert erhöhte sich geringfügig auf 0,08% nach 24 h und verringerte sich auf 0,01% nach 48 h. Vor der 3. Vakzination lagen die Werte für die MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉ und die MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ spezifischen CD8⁺ T-Zellen bei 0,01%. Die Anzahl der Zellen, die spezifisch auf das Peptid MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉ reagierten, erhöhte sich nach 24 h auf 0,03%, während bei dem MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ Peptid ein Anstieg auf 0,05% mit einem Rückgang auf 0,01% nach 48 h gemessen wurde. Während der 4. und 5. Vakzination verringerte sich die Frequenz der MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉ spezifischen CD8⁺ T-Zellen von 0,03% auf 0,01% bzw. von 0,05% auf 0,01%. Ein Rückgang von 0,05% auf 0,01% wurde auch bei den MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ spezifischen CD8⁺ T-Zellen während der 4. Vakzination beobachtet, während diese Zellen innerhalb der 5. Vakzination mit 0,02% konstant blieben. Nach der ersten und zweiten Vakzination wurden bei Patient HKR auch am Tag 6 nach Vakzination die Frequenzanalysen durchgeführt. Die Frequenzwerte der spezifisch reagierenden T-Zellen lagen für beide Peptide zwischen 0,01%-0,04% und somit niedriger als die Werte vor den jeweiligen Vakzinationen.

Bei Patient ARU konnten vor der 1. Vakzination keine MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉ spezifischen CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden. Erst 24 h danach stieg die Prozentzahl dieser Zellen auf 0,06% an und lag nach 48 h bei 0,03%. Vor der 2. Vakzination reagierten 0,07% der CD8⁺ T-Zellen spezifisch auf das Peptid MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉, während nach 24 h und 48 h nur noch 0,01% dieser Zellen im peripheren Blut gefunden wurden. Nach der 3. Vakzination wurde ein 10facher Anstieg von 0,02% auf 0,2% der MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉ -reaktiven CD8⁺ T-Zellen gemessen. Im weiteren Verlauf der Therapie sank die Frequenz dieser Zellen bis unter die Nachweisgrenze ab. Es konnten 0,04% MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ spezifische CD8⁺ T-Zellen vor der 1. Vakzination identifiziert werden, während 24 h danach diese Zellen im Blut nicht mehr zu detektieren waren. Im 2. Vakzinationszyklus stiegen die MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ -spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach 24 h von 0,02% auf 0,07% und im 3. Vakzinationszyklus von 0,02% auf 0,08% an. Im 4. Vakzinationszyklus konnten weder MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉ - noch MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ -spezifische CD8⁺ T-Zellen detektiert werden. Mit dieser Entwicklung korrelierte der klinische Verlauf dieses Patienten, der nach der 4. Vakzination durch Tumorprogression und malignen Pleuraerguß geprägt wurde.

4.1.7.2 Frequenzanalysen bei HLA-A2⁺ Patienten

Die Frequenzanalysen wurden bei den HLA-A2⁺ Patienten mit insgesamt 9 HLA-A2-restringierten Peptiden (Peptidsequenz siehe Tabelle 1) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 9 und Abbildung 10 dargestellt. Bei Patient HIG wurden 5 der 8 Vakzinationszyklen bezüglich spezifisch reagierender CD8⁺ T-Zellen untersucht. Vor der 1. Vakzination konnten außer für MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ keine anderen Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen detektiert werden. Ein 2,5facher Anstieg dieser MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ spezifischen Zellen wurde nach 24 h festgestellt. Nach 48 h hingegen sank der Wert wieder unter die Nachweisgrenze. Ein Anstieg der Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ spezifischen CD8⁺ T-Zellen auf 0,08% wurde 24 h nach der Vakzination gemessen. Nach 48 h konnten diese Zellen im peripheren Blut nicht mehr nachgewiesen werden. Die Anzahl der gp100₁₅₄₋₁₆₂ und der gp100₂₈₀₋₂₈₈ spezifischen CD8⁺ T-Zellen stieg 24 h nach der 1. Vakzination auf 0,02% bzw. auf 0,05% an. Während der Anteil der gp100₂₈₀₋₂₈₈ spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach 48 h konstant blieb, erhöhte sich die Anzahl der gp100₁₅₄₋₁₆₂ spezifischen Zellen auf 0,05%. Vor der 2. Vakzination lagen die Frequenzwerte für die unterschiedlichen Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zwischen 0,01% und 0,07%. Erneut wurde ein Anstieg der MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ spezifischen Zellen von 0,02% auf 0,05% beobachtet, während die Anzahl der Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ spezifischen Zellen auf 0,04% anstieg. Bei dieser Vakzination konnten erstmals auch Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈ spezifische CD8⁺ T-Zellen in geringem Maße (0,03%) detektiert werden.

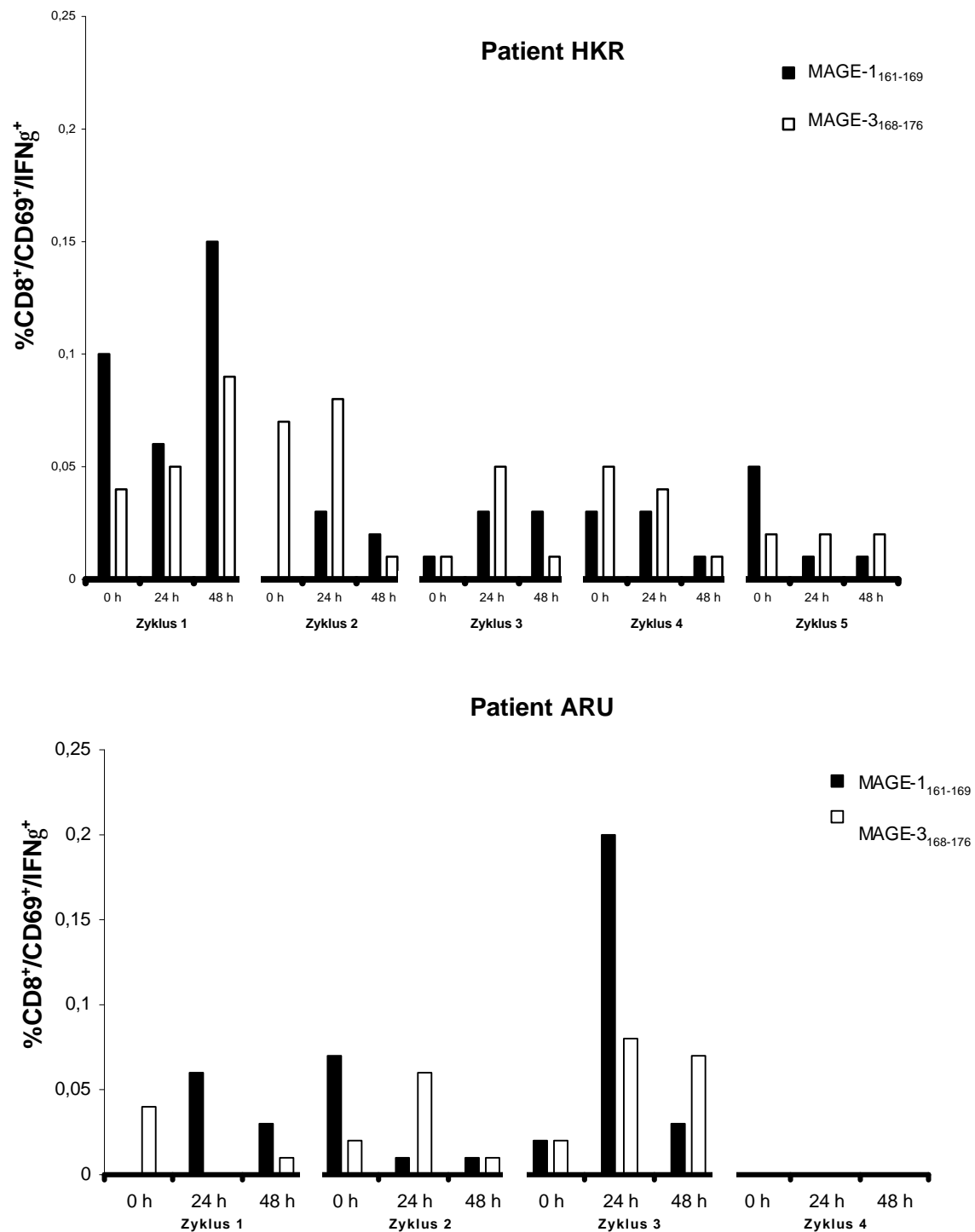


Abbildung 8: Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8⁺/CD69⁺/IFN γ -produzierenden T-Zellen bei Patient HKR und ARU vor und nach Peptid-Vakzination während der 4-5 Vakzinationszyklen. Die Frequenzen im peripheren Blut wurden nach Peptidstimulation mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung bestimmt.

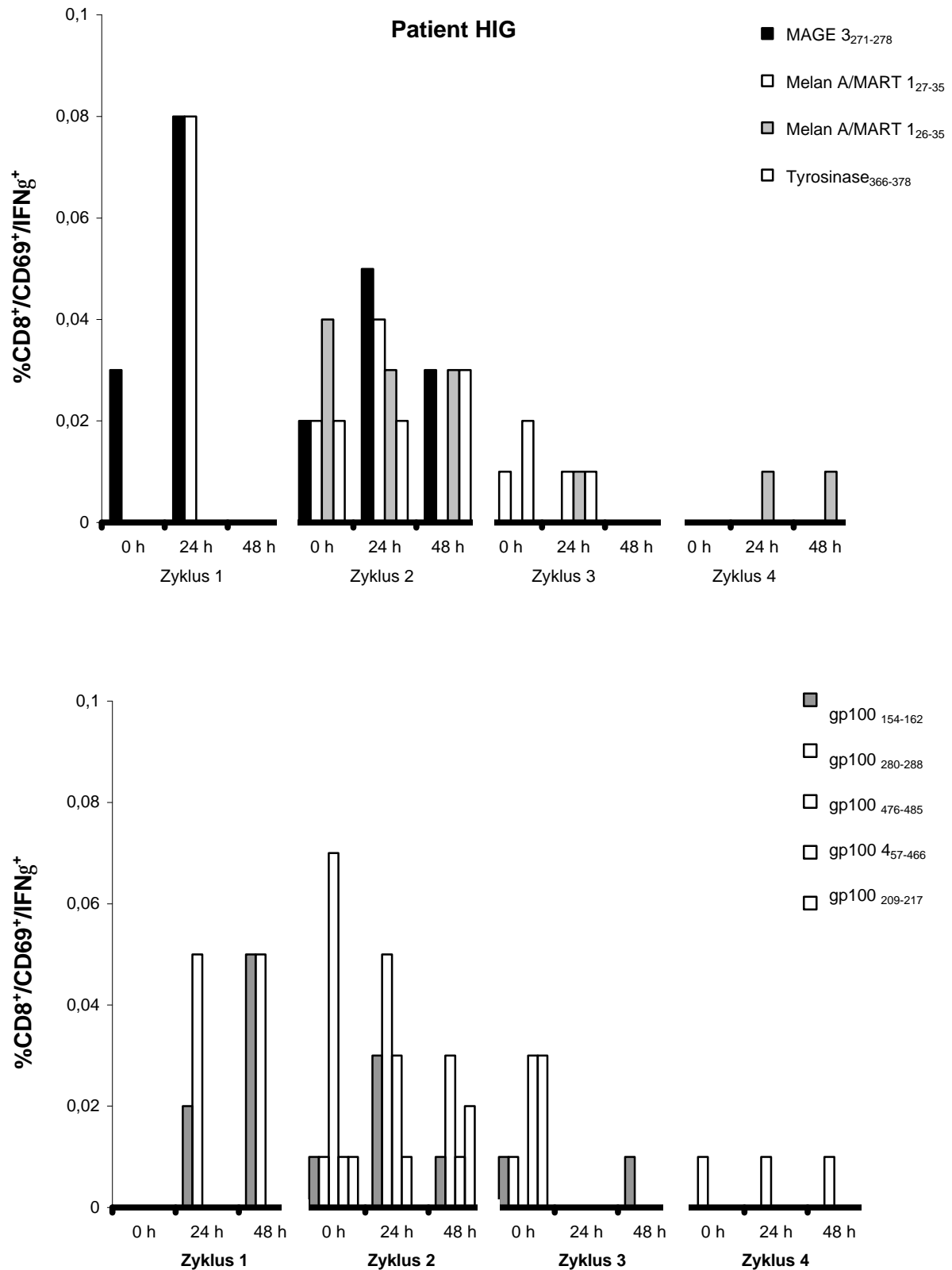


Abbildung 9: Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8⁺/CD69⁺/ IFN_γ-produzierenden T-Zellen bei Patient HIG und vor und nach Peptid-Vakzination während der 4 Vakzinationszyklen. Die Frequenzen im peripheren Blut wurden nach Peptidstimulation mittels intrazellulärer IFN_γ-Färbung bestimmt.

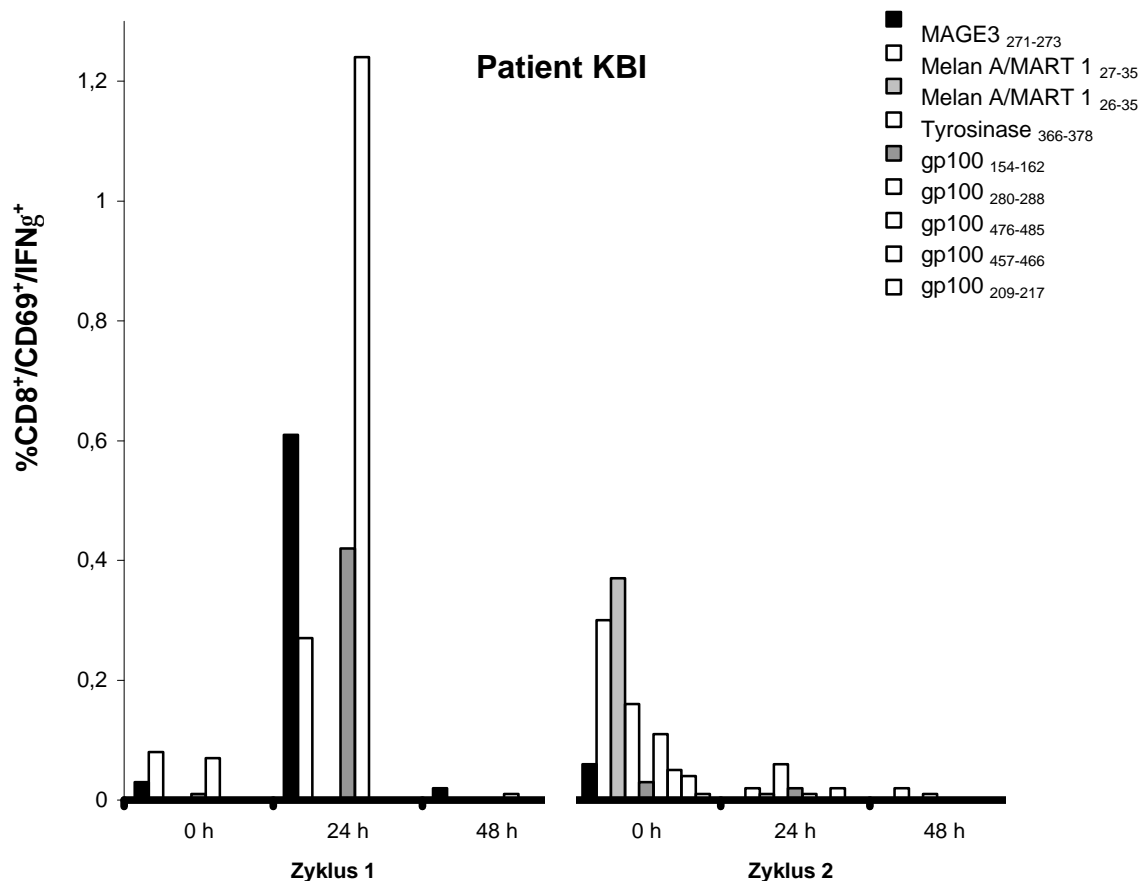


Abbildung 10: Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8⁺/CD69⁺/IFN γ -produzierenden T-Zellen bei Patient KBI vor und nach Peptid-Vakzination während der 2 Vakzinationszyklen. Die Frequenzen im peripheren Blut wurden nach Peptidstimulation mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung bestimmt.

Ein relativ hoher Anteil von 0,07% an gp100₂₈₀₋₂₈₈ spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde erst vor der 2. Vakzination gemessen. Ein Rückgang dieser Zellen auf 0,03% und 0,01% wurde 24 h bzw. 48 h nach der Vakzination beobachtet. Die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen, die auf die Peptide gp100₁₅₄₋₁₆₂ und gp100₂₈₀₋₂₈₈ reagierten, war nach 24 h bei 0,03% bzw. bei 0,05% und fiel nach 48 h wieder ab. Während des 3. und 4. Vakzinationszyklus konnten weder vor, noch nach der Vakzination, MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ spezifische CD8⁺ T-Zellen detektiert werden. Vor der 3. Vakzination zeigten jeweils 0,03% der CD8⁺ T-Zellen eine Reaktion auf die Peptide gp100₄₅₇₋₄₆₆ bzw. gp100₂₀₉₋₂₁₇. Nach 24 und nach 48 Stunden lag die Frequenz dieser Zellen unter der Nachweisgrenze. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen nahm die Frequenz der spezifisch reagierenden CD8⁺ T-Zellen insgesamt ab. Während des 4. und 5. Vakzinationszyklus lagen die Frequenzen für alle Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit 0,01%-0,02% nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze oder unterhalb dieses Wertes.

Bei Patient KBI wurden die Untersuchungen bei zwei von insgesamt drei Vakzinationszyklen durchgeführt. Vor der Vakzination zeigten die meisten CD8⁺ T-Zellen, außer bei MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ (0,05%), Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ (0,08%) und gp100₂₈₀₋₂₈₈ (0,08%) keine Reaktion auf die Melanom-spezifischen Peptide. Ein mehrfacher Anstieg dieser Zellen wurde 24 h nach der 1. Vakzination gemessen. So reagierten 1,25% der gesamten CD8⁺ T-Zellen mit IFN γ -Produktion spezifisch auf das Peptid gp100₄₇₆₋₄₈₅. Ein Anstieg der Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ spezifischen Zellen auf 0,25% konnte ebenfalls 24 h nach der Vakzination gemessen werden. Auch die Frequenzen der MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ (0,6%) und die der gp100₁₅₄₋₁₆₂ spezifischen Zellen (0,42%) waren vielfach höher als bei jedem anderen Patienten und den dort eingesetzten Peptiden. Zum Zeitpunkt 48 h nach Vakzination sanken die meisten Werte unter die Nachweisgrenze. Vor der 2. Vakzination konnten spezifische CD8⁺ T-Zellen gegen die Mehrheit der Peptide detektiert werden, in einem Frequenzbereich von 0,2-0,4%. Nach 24 h und 48 h waren diese Zellen im peripheren Blut nur noch in geringer Frequenz vorhanden oder nicht mehr nachweisbar.

Als Kontrollpeptide wurden bei den HLA-A1⁺ Patienten die Peptide MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ und CMVpp₆₅ und bei den HLA-A2⁺ Patienten die Peptide MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ und CMVpp₆₅ eingesetzt. Die Werte, die nach Stimulation mit diesen Peptiden gemessen wurden, lagen bei jedem Patienten im Bereich der unstimulierten Probe. Bei den Patienten HKR und HIG wurde die Frequenz der Peptid-spezifischen T-Zellen während der ersten drei Vakzinationen auch zu einem Zeitpunkt von sieben Tagen nach Vakzination bestimmt. Es zeigte sich, dass nach dieser Zeit keine Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut vorhanden waren.

Generell wurden bei den Peptid-vakzinierten Melanompatienten nur sehr geringe Frequenzen von Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut detektiert. Eine vergleichsweise hohe Frequenz wurde allgemein in den ersten Vakzinationszyklen gemessen. Eine Induktion von Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde bei den Patienten HIG und KBI 24h nach Vakzination beobachtet. Mit zunehmender Anzahl der Vakzinationszyklen nahm die Frequenz dieser Zellen im peripheren Blut ab. Die gleiche Tendenz wurde bei Patient HKR festgestellt. Bei Patient ARU ist hingegen erst im 3. Vakzinationszyklus ein Anstieg Peptid-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut zu beobachten.

4.2 Hybridzell-Vakzination

4.2.1 Strategie

Das maligne Melanom ist ein antigener Tumor, der von spezifischen Lymphozyten erkannt werden kann. Die Immunantwort gegen den Tumor basiert hauptsächlich auf unspezifischen NK-Zellen und auf Tumor-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Im Laufe der Krankheit treten jedoch Defekte auf, die zu einem Verlust oder zu einer reduzierten Funktionalität der Tumor-spezifischen T-Zellen führen. Hierzu werden unterschiedliche Ursachen, wie mangelnde Ko-Stimulation, Anergie, Antigen-Verlust auf Seiten des Tumors und Sekretion von immunsuppressiven Substanzen, diskutiert. Ziel einer Immuntherapie ist die Wiederherstellung bzw. die Verstärkung der T-Zell-vermittelten Immunreaktion durch optimale Stimulation der Tumor-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Eine optimale Stimulation sollte die Ko-stimulatorischen Moleküle, die der Tumor selbst nicht exprimiert, ersetzen. Durch die Fusion von autologen Tumorzellen mit allogenen dendritischen Zellen (DC) von gesunden Spendern, unter Generierung von Hybridzellen, sollte die Antigenität des Tumors mit der immunogenen Aktivierungskapazität der DC in Verbindung gebracht werden. Eine optimale Aktivierung der CTL-Vorläufer findet nur dann statt, wenn Antigene für diese Zellen und für die T-Helferzellen von **einer** antigenpräsentierenden Zelle (APC) präsentiert werden (Ridge *et al.*, 1998). Diese Eigenschaft wird durch die Hybridzelle erfüllt. Nach der Fusion der beiden Zelltypen weist die Hybridzelle MHC-I-Moleküle mit den entsprechenden Antigenen des Tumors auf, die für die Aktivierung der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen verantwortlich sind. Die MHC-II-Moleküle, die von der allogenen DC in die Hybridzelle eingebracht werden, führen zu einer starken allogenen, CD4-restringierten Immunantwort. Die hiermit in unmittelbarer Nähe der CTL aktivierten CD4⁺ Th-Zellen fördern durch Ausschüttung von Zytokinen wie IL-2, IFN γ , TNF α die spezifische Immunantwort der CTL. Zusätzlich werden durch die kostimulatorischen Moleküle der DC die Defekte der Tumorzelle in dieser Hinsicht korrigiert, eine optimale Stimulation der CTL wird ermöglicht und somit kann ein antigener Tumor wieder immunogen gemacht werden. Das Konzept der Hybridzell-Vakzine wurde in einem Thymom-Mausmodell (Stuhler *et al.*, 1994) und in einem Leberzellkarzinom-Rattenmodell (Guo *et al.*, 1994) eingesetzt. Die Tiere konnten effizient von transplantierten Tumoren geheilt werden und zeigten eine langanhaltende Immunität gegen den Tumor. Es konnte gezeigt werden, dass eine Fusion der beiden Zelltypen für eine effektive antitumorale Antwort notwendig ist. Die Vakzination mit nicht fusionierten Antigen-präsentierenden Zellen und Tumorzellen führte nicht zu einem Tumorrückgang. Die durch die Hybridzell-Vakzine induzierte spezifische CTL-Antwort umfasst alle von der Tumorzelle präsentierten Antigene und ermöglicht einen Angriff der aktivierten Tumor-spezifischen CTL, der zur Eliminierung des Tumors führen kann.

4.2.2 Patienten

Es wurden sechs Melanom-Patienten im Krankheitsstadium III und IV für eine Vakzination mit Hybridzellen ausgewählt. Sie erhielten zur Zeit der Hybridzell-Vakzination keine weitere onkologische Therapie. Bezüglich des HLA-Typus war ein Patient HLA-A1⁺ und fünf Patienten waren HLA-A2⁺. Um sicherzustellen, dass das Immunsystem dieser Patienten noch intakt ist, wurde ein Multitest immignost® durchgeführt und nur die Patienten in die Studie einbezogen, die eine positive Antwort auf mindestens eines der *Recall*-Antigene aus dem Test zeigten.

4.2.3 Therapie

Die Hybridzellen wurden aus Tumorzellen des jeweiligen Patienten und Antigen-präsentierenden Zellen gesunder Spender hergestellt. Unmittelbar nach Exzision der Metastasen wurden die Tumorzellen durch mechanische Zerkleinerung und enzymatische Behandlung isoliert (siehe Material und Methoden). Die zur Antigen-Präsentation verwendeten dendritischen Zellen wurden aus Monozyten nach Kultivierung mit entsprechenden Zytokinen generiert. Die beiden Zelltypen wurden mittels Elektrofusion verschmolzen, danach gewaschen, in 5% Glukose aufgenommen und mit 200 Gy bestrahlt. Die Patienten erhielten mindestens 2 Hybridzell-Vakzinationen mit durchschnittlich 5×10^7 Tumorzellen in 5%iger Glukose, die subkutan appliziert wurden. Die Vakzination wurde alle vier Wochen wiederholt.

Die Hybridzell-Vakzination verursachte nur geringe Nebenwirkungen. Einige Patienten zeigten lokale Rötungen und Schwellungen an der Injektionsstelle. Bei anderen Patienten traten an der Injektionsstelle leichte Schmerzen auf. Vereinzelt reagierten die Patienten auch mit leicht erhöhter Temperatur. Es wurden keine Anzeichen von Autoimmunreaktionen beobachtet.

Die allgemeine Reaktion auf die Immuntherapie wurde vier Wochen nach der 3. Vakzination mittels klinischer Untersuchungen wie CT und Ultraschall evaluiert. Ein klinisches Ansprechen wurde als komplette Remission (CR) bei einem vollständigen Rückgang des Tumors, als partielle Remission (PR) bei mehr als 50% Rückgang und als stabile Erkrankung (SD) bei einer Progression bis 25% oder Rückgang bis 50% der Tumormasse definiert.

4.2.4 Klinisches Ansprechen

Bei einem Patienten konnte eine komplette Remission erzielt werden. Zwei weitere Patienten zeigten eine Stabilisierung der Krankheit über mehrere Monate. Bei Patient MDU zeigte sich

nach einer Vakzinierung eine völlige Regression der vorhandenen kutanen Metastasen an einem Bein (CR). Der Patient erhielt weitere Vakzinierungen für die Dauer eines Jahres, um diesen Zustand aufrecht zu erhalten. Bei Patient FKÖ mit Metastasen axillär und der Gallenblase wurde nach zwei Zyklen eine Progredienz der Erkrankung festgestellt und die Vakzinierung abgebrochen (PD). Bei Patient NRO mit mediastinalen, renalen und mesenterialen Metastasen wurde nach drei Zyklen Vakzinierung ebenfalls eine Progredienz (PD) festgestellt. Bei Patient WCO mit pulmonalen, abdominellen, retroperitonealen und einer Bauchdeckenmetastase wurde durch die Vakzinierung für 15 Monate eine stabile Erkrankung induziert (SD). Bei Patient IKL mit disseminierten kutanen Filiae zeigte sich im Verlauf der Vakzinierung sowohl ein Rückgang einiger Metastasen, als auch das Neuauftreten von Metastasen (SD bzw. *mixed response*). Bei Patient UTR mit ausgeprägten cervikalen Lymphknotenpaketen zeigte sich über 12 Monate eine stabile Erkrankung (SD).

4.2.5 Immunhistologie

Die Tumorpräparate (Paraffinschnitte) der o.g. Patienten wurden vor der Vakzinierung immunhistologisch auf das Vorhandensein von Tumorantigenen und T-Zellinfiltraten untersucht. Als Tumormarker wurden spezifische mAK gegen Tumorantigene wie Tyrosinase, gp100, Melan A/MART 1, MAGE 1 und MAGE 3 eingesetzt. Die infiltrierenden T-Zellen wurden mittels mAK gegen die Oberflächenmoleküle CD3, CD4 und CD8 charakterisiert. Die Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Immunhistologische Untersuchungen von Melanommetastasen der mit der Hybridzell-Vakzine behandelten Patienten mit mAK gegen Tumormarker (Tyrosinase, gp100, Melan A/MART 1, MAGE 3) und mAK gegen T-Zellmarker (CD3, CD8, CD4). Quantifizierung: +++, 80-100% der Zellen positiv; ++, 50-80% der Zellen positiv; +, 20-50% der Zellen positiv; (+), 5-20% der Zellen positiv; -, 0-5% der Zellen positiv.

HLA-A*0201 Patienten	CD3	CD8	CD4	Tyrosinase	gp100	Melan A/ MART 1	MAGE 3
WCO	+	+	-	+	(+)	-	-
IKL	(+)	-	(+)	-	+	-	-
MDU	+	+	-	++	++	++	++
NRO	++	+	+	+	-	+	+
UTR	++	++	-	+	+	-	-

HLA-A*01 Patient	CD3	CD8	CD4	Tyrosinase	gp100	Melan A/ MART 1	MAGE-1/ MAGE-3
FKÖ	++	+	-	+	+	+	(+) / -

Alle Patienten zeigten eine moderate Expression der Tumormarker. Bei den Patienten WCO und IKL waren nur 20% der Tumorzellen positiv für einen Tumormarker. Die Anzahl der infiltrierenden T-Zellen lag bei diesen Patienten in dem Bereich von 5-20%. Bei den Patienten NRO, UTR und FKÖ war die Expression der Tumorantigene in einem Bereich von 20-40% der Zellen. Bei Patient MDU hingegen waren 50-80% der Tumorzellen positiv für diese Tumorantigene. Ein hohes T-Zellinfiltrat in der Tumorprobe war bei den Patienten NRO, UTR und FKÖ vorhanden. Die Patienten UTR und FKÖ hatten im T-Zellinfiltrat eine hohe Anzahl (50-60%) von CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Bei Patient NRO waren neben CD8⁺ T-Zellen auch 50% CD4⁺ T-Zellen im Tumorinfiltrat vorhanden.

4.2.6 Frequenzanalysen von Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen unter Therapie

Ziel der Hybridzell-Vakzination war eine Induktion von tumorspezifischen CD8⁺ T-Zellen. Um den Effekt des Therapieansatzes zu untersuchen, wurde die funktionale Kapazität von T-Zellen gegen bekannte, häufig vorkommende Melanomantigene (siehe Tabelle 1) analysiert. Voraussetzung für die Auswahl der Peptide (Epitope) war das Vorhandensein der entsprechenden Antigene auf Tumorseite, was immunhistologisch gesichert wurde.

Bei den fünf HLA-A*0201⁺ Patienten wurden im peripheren Blut die Frequenzen der für die neun HLA-A*0201-restringierten Peptide spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Tabelle 1) untersucht. Im Falle des HLA-A*01⁺ Patienten erfolgte eine Quantifizierung derjenigen CD8⁺ T-Zellen, die spezifisch auf die zwei HLA-A*01-restringierten Peptide (Tabelle 1) reagierten. Entsprechende Frequenzen wurden in einzelnen Fällen auch in der Tumor-infiltrierenden T-Zellpopulation (TIL) bestimmt. Der Anteil der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut wurde mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung vor der Vakzination (0 h), sowie 24 h und 48 h nach der Vakzination gemessen. Als Kontrollen für eine unspezifische Stimulation wurden Peptide verwendet, die an keine der exprimierten MHC Moleküle binden, oder die gleiche MHC-Restriktion besitzen, aber nicht Melanom-spezifisch sind. Zu der aktivierten T-Zellpopulation wurden diejenigen CD8⁺ T-Zellen gerechnet, die mittels IFN γ -Produktion und CD69-Expression auf die Stimulation mit Peptiden reagierten. Da in Kinetikexperimenten festgestellt wurde, dass die Expression von CD8 auf T-Zellen nach Stimulation herunterreguliert wird, wurde für die Auswertung der Frequenzen Peptid-spezifischer Zellen die gesamte CD8⁺-Population (intermediär- und CD8-hoch-exprimierenden Zellen) einbezogen. Die Frequenzen Peptid-spezifischer T-Zellen sind als Prozentsatz der CD69⁺/IFN γ ⁺ Zellen von der CD8⁺ Population angegeben (siehe Abbildung 14). Diese Werte wurden jeweils um den Hintergrund (unstimulierte Probe) korrigiert.

Bei dem HLA-A*01⁺ Patienten FKÖ konnten weder vor noch nach der Hybridzellvakzination Peptid-spezifische CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut detektiert werden. Auch im Tumormaterial dieses Patienten konnten keine Tumor-spezifischen T-Zellen identifiziert werden. Bei Patient FKÖ war auch nach der Behandlung eine Progression der Krankheit zu vermerken.

4.2.6.1 Frequenzanalysen bei HLA-A*0201⁺ Patienten

Bei den 5 HLA-A*0201⁺ Patienten wurden Melanom-spezifische T-Zellen detektiert und deren Frequenz vor und nach der Hybridzell-Vakzination bestimmt. Die Ergebnisse eines Vakzinationszyklus der ersten drei Patienten sind in Tabelle 6 dargestellt. Bei diesen Patienten konnte, im Gegensatz zu den beiden anderen, bei denen das Immunmonitoring über einen längeren Zeitraum durchgeführt wurde, nur eine einmalige Bestimmung der Frequenzen Peptid-spezifischer CD8⁺ T-Zellen vorgenommen werden.

Tabelle 6: Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8⁺/CD69⁺, IFN γ -produzierenden T-Zellen im peripheren Blut bei Melanompatienten vor Vakzination (0h), sowie 24h und 48h nach Vakzination. Die Werte sind als Prozentsatz derjenigen CD8⁺ T-Zellen angegeben, die nach entsprechender Peptid-Stimulation IFN γ produzieren und CD69 exprimieren.

<i>Pat.</i>	<i>WCO</i>			<i>IKL</i>			<i>MDU</i>		
	<i>0 h</i>	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>	<i>0 h</i>	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>	<i>0 h</i>	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>
MAGE-3 ₂₇₁₋₂₇₈	0	0,01	0,01	0,05	0,04	0	0	0,14	0,13
Melan A/MART-1 ₂₇₋₃₅	0	0	0,01	0	0,12	0	0	0,11	0,07
Melan A/MART-1 ₂₆₋₃₅	0,02	0	0,02	0,05	0,06	0,05	0,1	0,64	0
Tyrosinase ₃₆₆₋₃₇₈	0	0	0,01	0,01	0,08	0	0	0,05	0,06
gp100 ₁₅₄₋₁₆₂	0	0	0	0,02	0,06	0,06	0,18	0	0
gp100 ₂₈₀₋₂₈₈	0	0,02	0,01	0,02	0,02	0	0	0	0,01
gp100 ₄₇₆₋₄₈₅	0	0	0,01	0,01	0,01	0,04	0,2	0,26	0,03
gp100 ₄₅₇₋₄₆₆	0	0	0,01	0	0,01	0	0,14	0,1	0
gp100 ₂₀₉₋₂₁₇	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0	0	0	0

Bei Patient WCO lagen die Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durchgängig an der Nachweisgrenze.

Bei Patient IKL erhöhte sich 24h nach der Vakzination die Frequenz der Melan A/MART 1₂₇₋₃₅-spezifischen CD8⁺ Zellen von 0% auf 0,12% und die der gp100₄₇₆₋₄₈₅-spezifischer T-Zellen von 0,02% auf 0,06%. Nach 48h sanken diese Werte wieder unter die Nachweisgrenze. Die Frequenz der Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈-spezifischen CD8⁺-T-Zellen erhöhte sich von 0,01% vor Vakzination auf 0,08% nach der Vakzination und konnte nach 48h im peripheren Blut nicht mehr detektiert werden.

Bei diesem Patienten konnten TILs aus frischem Tumormaterial isoliert und kultiviert werden. Nach 7 Tagen in Kultur wurde die Frequenz Peptid-spezifischer CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Es reagierten 0,08% der CD8⁺ kultivierten Zellen auf das Peptid gp100₂₈₀₋₂₈₈. Die Frequenzen

der CD8⁺ T-Zellen mit Spezifität für die restlichen eingesetzten HLA-A*0201 Peptide lagen zwischen 0,01% und 0,05%.

Der Patient MDU zeigte insgesamt höhere T-Zellfrequenzen im peripheren Blut für die einzelnen Tumor-assoziierten T-Zellepitope. Die höchste Frequenz wurde mit 0,64% für das Peptid Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ zum Zeitpunkt 24h nach der Vakzination gemessen. Zu diesem Zeitpunkt wurde weiterhin ein Anstieg der CD8⁺ T-Zellen spezifisch für das Peptid MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ und Melan A/MART 1₂₇₋₃₅ auf 0,14% bzw. 0,11% gemessen. Auffallend bei diesem Patienten war die hohe IFN γ -Produktion auch bei nicht-stimulierten Zellen, was auf den *in vivo* aktivierten Status dieser Zellen hinweist. Ebenfalls auffällig war die hohe Frequenz gp100₄₇₆₋₄₈₅-spezifischer T-Zellen (0,18%) bereits vor Vakzination und die Abnahme der Frequenz dieser Zellen im peripheren Blut nach der Vakzination.

Die HLA-A*0201⁺-Patienten NRO und UTR wurden über einen längeren Zeitraum mit der Hybridzellvakzine behandelt und Therapie-begleitend wurde ein entsprechendes Monitoring der TAA-spezifischen T-Zellen durchgeführt. Aufgrund der hohen Frequenzen der TAA-spezifischen T-Zellen wurde bei diesen Patienten eine detaillierte Charakterisierung dieser Zellen vorgenommen.

4.2.6.1.1 Patient NRO

Abbildung 11 zeigt die Veränderung der Frequenzen der reaktiven Tumor-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Verlauf des Therapieversuchs über fünf Behandlungszyklen. Schon vor Beginn der Vakzination konnte eine hohe Frequenz an Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ spezifischen T-Zellen detektiert werden (1,16%), die im Verlauf des 1. Vakzinationszyklus nahezu stabil blieb. Bei diesem Patienten nahm die Frequenz der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Therapieverlauf tendenziell zu.

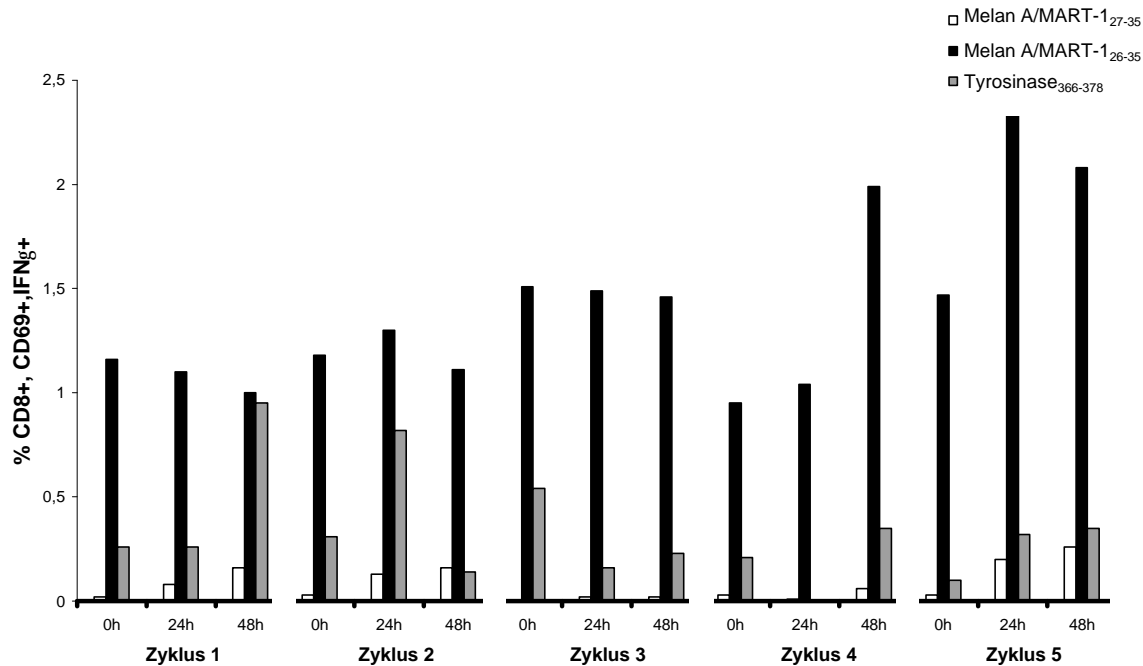


Abbildung 11: Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8⁺/CD69⁺, IFN γ -produzierenden T-Zellen bei Patient NRO vor und nach Hybridzell-Vakzination während der 5 Vakzinationszyklen. Die Frequenzen im peripheren Blut wurden nach Peptidstimulation mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung bestimmt. Dargestellt sind nur die Peptide, die eine Reaktion der T-Zellen induzierten.

Hingegen wurden vor der 1. Vakzination nur 0,02% Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ spezifische CD8⁺ T-Zellen gemessen. Der Anteil dieser Zellen steigerte sich im peripheren Blut 24 h nach Vakzination auf 0,08% und nach 48 h auf 0,16%. Vor der Vakzination und nach 24 h reagierten 0,26% der CD8⁺ T-Zellen auf das Peptid Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈. Nach 48 h verdreifachte sich die Frequenz dieser Zellen im peripheren Blut.

Vor dem zweiten Vakzinationszyklus war die Frequenz der Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ spezifischen Zellen mit 1,18% vergleichbar mit dem Basiswert vor der 1. Vakzination. Ein Anstieg dieser Zellen auf 1,3% wurde nach 24 h vermerkt und ein Rückgang auf 1,11% nach 48 h. Auch im 2. Vakzinationszyklus konnte eine Induktion der Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ spezifischen T-Zellen beobachtet werden. Der prozentuale Anteil dieser Zellen verfünffachte sich auf 0,16% nach 48 h. Der Anteil der Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈ spezifischen CD8⁺ T-Zellen war vor der 2. Vakzination bei 0,31% und 24 h nach Vakzination bei 0,82%. Ein Rückgang dieser Zellen im peripheren Blut auf 0,14% wurde 48 h nach Vakzination vermerkt.

Während des dritten Vakzinationszyklus blieb die Frequenz der Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ spezifischen T-Zellen mit 1,5% annähernd konstant. Es wurden vor der Vakzination keine T-Zellen, spezifisch für das Melan A/MART-1₂₇₋₃₅-Peptid, detektiert. Auch 24 h und 48 h nach

Vakzination lag die Frequenz dieser Zellen mit 0,02% an der Nachweisgrenze. Vor dieser Vakzination reagierten 0,54% der CD8⁺ T-Zellen auf das Peptid Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈. Zum Zeitpunkt 24 h nach Vakzination erfolgte ein Rückgang auf 0,16% mit anschließendem Anstieg auf 0,23% nach 48 h.

Im vierten Vakzinationszyklus verdoppelte sich die Frequenz der Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ spezifischen CD8⁺ T-Zellen von 0,95% vor der Vakzination auf 1,99% 48 h nach der Vakzination, während nach 24 h nur ein geringer Anstieg beobachtet wurde. Die Frequenz der Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ spezifischen T-Zellen lag vor Vakzination bei 0,03% und 24 h und 48 h danach bei 0,01% bzw. 0,06%. Die Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈-spezifischen T-Zellen zeigten nach 24 h keine messbaren Frequenzen im peripheren Blut. Vor Vakzination reagierten 0,21% der CD8⁺ T-Zellen auf dieses Peptid. Nach 48 h wurde ein Anstieg auf 0,35% vermerkt.

Im fünften Vakzinationszyklus konnte zu jedem Zeitpunkt eine spezifische Reaktion auf die 3 Peptide vermessen werden. Die Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ spezifischen CD8⁺ T-Zellen stiegen von 1,47% vor Vakzination auf 2,35% 24 h nach Vakzination an. Ein Rückgang dieser Zellen im peripheren Blut auf 2,08% wurde 48 h nach Vakzination beobachtet. Bei den Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ spezifischen T-Zellen zeichnete sich ein Anstieg von 0,03% auf 0,20% nach 24 h und auf 0,26% nach 48 h ab. Die Frequenzen der Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈ spezifischen Zellen lagen vor Vakzination bei 0,10% und verdreifachten sich nach 24 h. Ein weiterer geringer Anstieg dieser Zellen im peripheren Blut auf 0,35% wurde auch nach 48 h vermerkt.

4.2.6.1.2 Patient UTR

Der Patient UTR wurde über einen Zeitraum von zwei Jahren mit der Hybridzell-Vakzine behandelt. Die Frequenzanalysen für die Peptid-spezifischen T-Zellen wurden erst gegen Ende der Therapie für vier Vakzinationszyklen durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen für die 9 HLA-A2-restringierten Peptide über diesen Zeitraum sind in Abbildung 12 zusammengefasst. Dargestellt sind nur die Daten derjenigen Peptidstimulationen, bei denen eine Reaktion beobachtet wurde. Vor der 20. Vakzination wurden hohe Frequenzen an Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut gemessen.

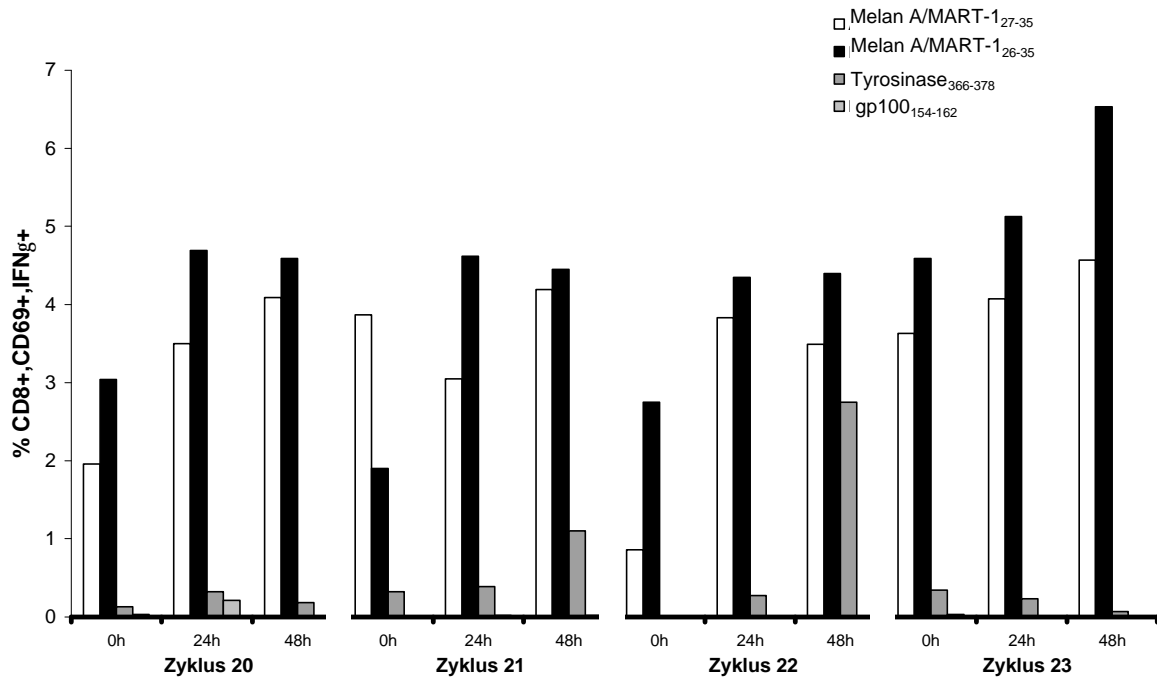


Abbildung 12: Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8⁺/CD69⁺, IFN γ -produzierenden T-Zellen bei Patient UTR vor und nach Hybridzell-Vakzination während 4 Vakzinationszyklen. Die Frequenzen im peripheren Blut wurden nach Peptidstimulation mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung bestimmt. Dargestellt sind nur die Peptide, die eine Reaktion der T-Zellen induzierten.

Die Frequenz der Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ spezifischen CD8⁺ T-Zellen lag vor der 20. Vakzination bei 3,04%. Nach 24 h erhöhte sich die Frequenz dieser Zellen auf 4,69% und verringerte sich nur geringfügig auf 4,59% 48 h nach Vakzination. Auch bei den Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ spezifischen T-Zellen war nach der Vakzination ein Anstieg zu vermerken. Diese Zellen stiegen im peripheren Blut von 1,96% vor Vakzination auf 3,5% nach 24 h und auf 4,09% 48h nach Vakzination an. Geringere Frequenzen an spezifischen T-Zellen wurden für die Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈- und gp100₁₅₄₋₁₆₂-Peptide gemessen. Vor Vakzination war die Frequenz der Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈ spezifischen T-Zellen bei 0,13%. 24 h nach Vakzination reagierten 0,32% der CD8⁺ T-Zellen auf dieses Peptid, nach 48 h jedoch nur noch 0,18%. Nur eine geringe Frequenz (0,03%) an gp100₁₅₄₋₁₆₂ spezifischen CD8⁺ Zellen wurde vor Vakzination detektiert. Ein signifikanter Anstieg dieser Zellen auf 0,21% wurde 24 h nach Vakzination gemessen. Nach 48 h wurden diese Zellen im peripheren Blut nicht mehr detektiert.

Vor dem 21. Vakzinationszyklus wurden 1,9% Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ spezifische CD8⁺ T-Zellen gemessen. Nach 24 h wurden mehr als doppelt (4,62%) so viele Zellen im peripheren Blut detektiert. Der Anteil verringerte sich nur geringfügig auf 4,45% nach 48 h. Ein relativ hoher Wert (3,87%) an Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ spezifischen T-Zellen wurde schon vor der 21.

Vakzination ermittelt. Ein Rückgang dieser Zellen im peripheren Blut auf 3,05% wurde nach 24 h beobachtet. Nach 48 h stieg der Anteil dieser Zellen mit 4,19% über den Vor-Vakzinationswert. Die Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈ spezifischen T-Zellen zeigten vor Vakzination und 24 h danach eine Frequenz von 0,32% bzw. 0,39%. 48 h nach Vakzination verdreifachte sich dieser Wert (1,1%) im peripheren Blut. Die Anzahl der gp100₁₅₄₋₁₆₂ spezifischen T-Zellen lag während dieses Vakzinationszyklus mit 0,02% an der Nachweisgrenze. Auch in den folgenden Vakzinationszyklen wurden Zellen mit dieser Spezifität nicht mehr im peripheren Blut detektiert.

Im 22. Vakzinationszyklus zeigte sich ein genereller Anstieg der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Vakzination. Es wurde ein Anstieg der Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ spezifischen T-Zellen von 2,75% auf 4,4% zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h nach Vakzination beobachtet. Vor dieser Vakzination zeigten 0,86% der CD8⁺ T-Zellen eine Reaktion auf das Peptid Melan A/MART-1₂₇₋₃₅. Nach 24 h wurde ein Anstieg auf 3,83% vermerkt. Die Frequenz dieser Zellen blieb auch nach 48 h mit 3,49% annähernd konstant. Hingegen wurden vor der Vakzination keine spezifischen T-Zellen für das Peptid Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈ detektiert. 24 h nach Vakzination wurde eine Reaktion auf dieses Peptid beobachtet. So reagierten 0,27% der CD8⁺ Zellen nach Stimulation mit Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈ spezifisch auf dieses Peptid. Die Frequenz dieser Zellen verzehnfachte sich (2,75%) nach 48 h.

Im 23. Vakzinationszyklus nahm die Frequenz der Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈-spezifischen T-Zellen von 0,34% vor Vakzination auf 0,23% nach 24 h bzw. 0,07% nach 48 h deutlich ab. Im Gegensatz dazu wurden für die beiden Melan A/MART-1 Peptide hohe Frequenzwerte gemessen. 4,59% der CD8⁺ T-Zellen reagierten vor dieser Vakzination auf das Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅. Nach 24 h stieg die Frequenz dieser Zellen auf 5,13% und nach 48 h auf 6,53% an. Die Frequenz der Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ spezifischen T-Zellen lag vor dieser Vakzination bei 3,63%. 24 h nach Vakzination lag der Anteil dieser Zellen bei 4,07%. Ein weiterer Anstieg auf 4,57% wurde nach 48 h gemessen.

Bei dem Patienten UTR wurde eine Frequenzbestimmung der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen unter den Tumor-infiltrierenden Zellen vorgenommen. Bei diesem Patienten erfolgte vor der 20. Vakzination eine Tumor-Exzision. Aus diesem Material konnten TILs gewonnen werden, die direkt zur Analyse der Frequenz von TAA-spezifischen T-Zellen eingesetzt wurden. Diese Ergebnisse wurden mit den Frequenzen an Tumor-spezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut zum gleichen Zeitpunkt verglichen. Die Untersuchungen zeigten im Tumor ein unterschiedliches Peptid-Erkennungsmuster verglichen mit den spezifischen Zellen im Blut (Abbildung 13).

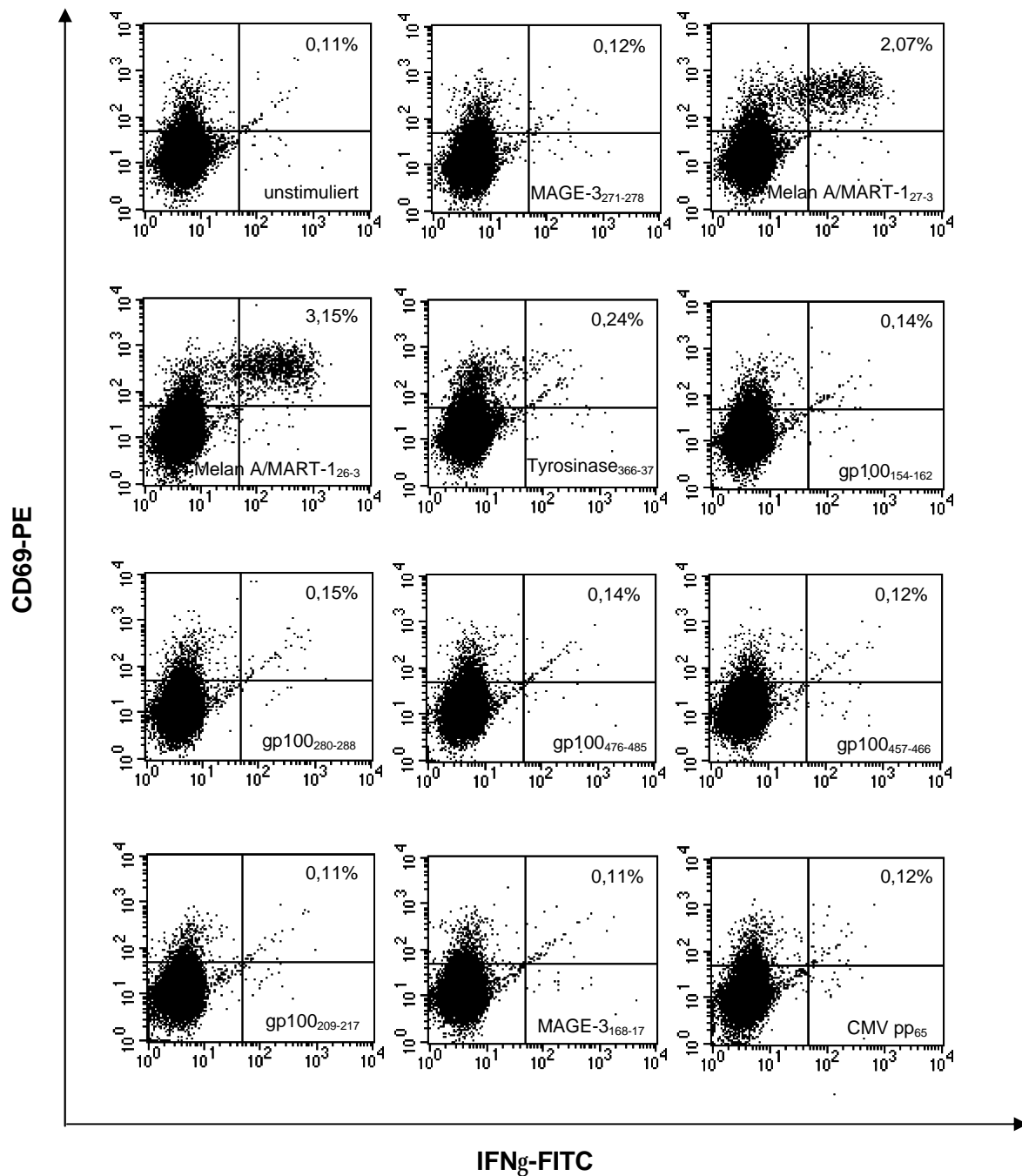


Abbildung 13: Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8⁺/CD69⁺, IFN γ -produzierenden T-Zellen im peripheren Blut des Patienten UTR zum Zeitpunkt der Tumorentnahme vor dem 20. Vakzinationszyklus. Die Frequenzen wurden mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung nach 5,5-stündiger Peptid-Stimulation und unter Zugabe von BFA ermittelt. Als Kontrollpeptide wurden das HLA-A*01-restringierte MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ Peptid und das HLA-A*0201-restringierte CMVpp₆₅ Peptid eingesetzt.

Während im peripheren Blut keine Zellen detektiert werden konnten, die auf das Peptid MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ eine Reaktion zeigten, reagierten in der tumorinfiltrierenden Population annähernd 1% spezifisch auf dieses Peptid (Abbildung 14). Im peripheren Blut wurden 24 h nach Vakzination CD8⁺ T-Zellen detektiert, die auf das Peptid gp100₁₅₄₋₁₆₂ reagierten (Abbildung 12). In der TIL-Population waren diese Zellen nicht vorhanden.

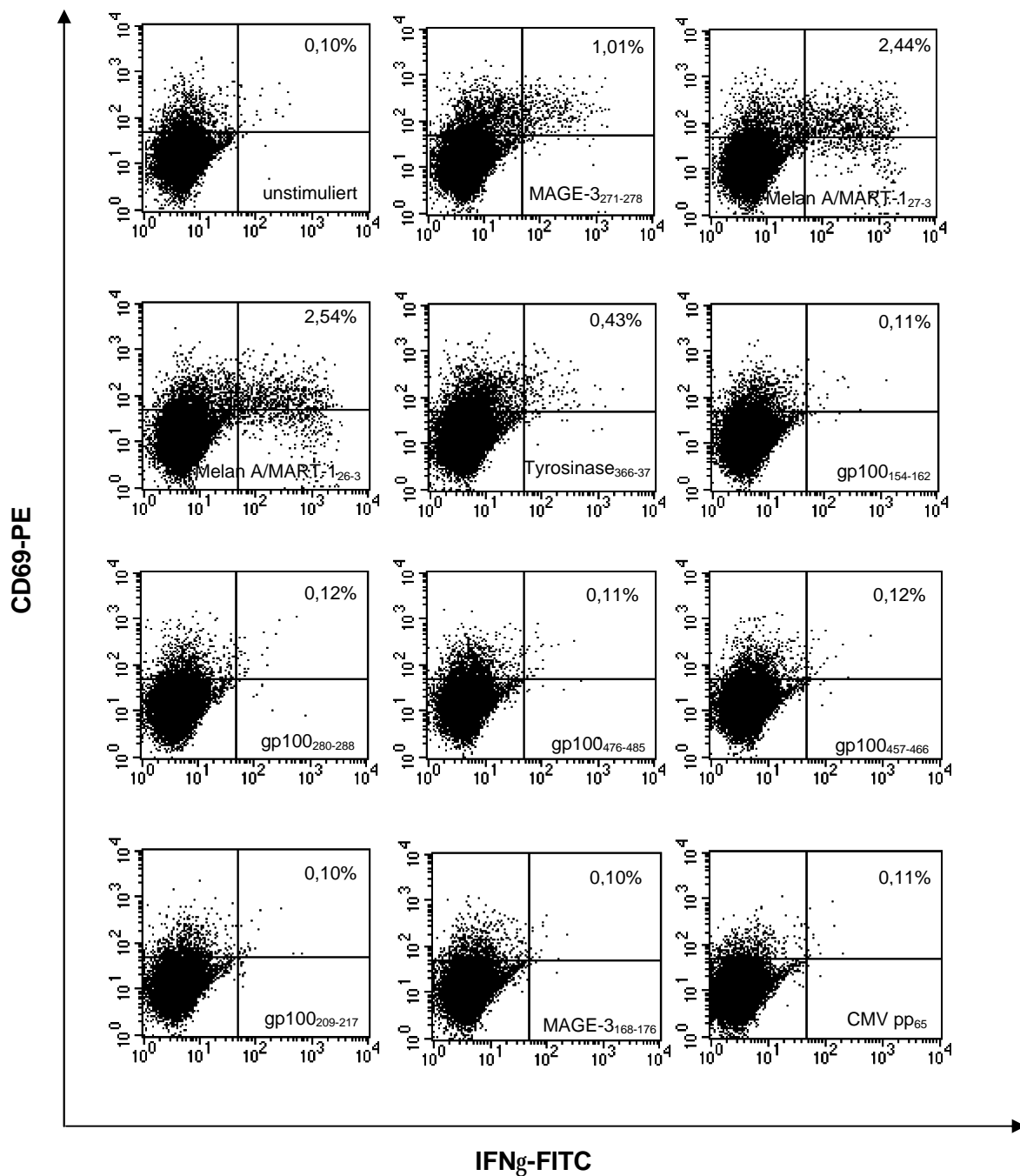


Abbildung 14: Frequenz der Peptid-spezifischen CD8⁺/CD69⁺, IFN γ -produzierenden T-Zellen im Tumor des Patienten UTR vor dem 20. Vakzinationszyklus. Die isolierten TILs wurden nach 5-tägiger Kultur für die intrazelluläre IFN γ -Färbung mit den Peptiden unter Zugabe von BFA für 5,5 h stimuliert und danach im FACS analysiert. Als Kontrollpeptide wurden das HLA-A*01-restringierte MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ Peptid und das HLA-A*0201-restringierte CMVpp₆₅ Peptid eingesetzt.

Die Frequenzen der für die Melan A/MART-1 Peptide spezifischen T-Zellen im peripheren Blut unterscheiden sich geringfügig von den Frequenzen in den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten. Während im peripheren Blut 1,96% der CD8⁺ T-Zellen mit IFN γ -Produktion und CD69 Expression auf das Peptid Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ reagierten, zeigten 2,34% der T-

Zellen aus dem Tumor eine Reaktion auf dieses Peptid. Ein umgekehrtes Verhältnis zeigte sich bei den T-Zellen, die spezifisch für das Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ waren. Hier war eine höhere Frequenz (3,04%) im Blut vorhanden, verglichen mit dem Anteil dieser Zellen (2,44%) im Tumor. Die Frequenz der Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈-spezifischen T-Zellen aus dem Tumor war mit 0,33% mehr als doppelt so hoch wie die im peripheren Blut (0,13%).

Eine höhere Frequenz von CD8⁺ T-Zellen spezifisch für das Mimotop Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ verglichen mit der Reaktion auf das natürliche Epitop Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ wurde sowohl bei Patient NRO als auch bei Patient UTR gemessen. Insgesamt zeigten die Frequenzanalysen der Peptid-spezifischen T-Zellen während der Hybridzell-Vakzination bei 3 Patienten eine sehr hohe Anzahl dieser Zellen im peripheren Blut. Bei diesen Patienten wurde allgemein nach Vakzination ein Anstieg Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut registriert. Diese Immunantwort korrelierte bei dem Patienten UTR mit einer Stabilisierung der Krankheit. Patient MDU zeigte eine komplette Remission der verbliebenen Metastasen nach einer Hybridzell-Vakzination.

Bei den unstimulierten Proben lag die Frequenz der IFN γ -produzierenden T-Zellen bei den jeweiligen Messungen zwischen 0% und 0,11%. Diese Werte wurden von den entsprechenden stimulierten Proben subtrahiert. Die Frequenzen der Proben, die mit den Kontrollpeptiden MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ (bei HLA-A*0201⁺ Patienten), MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ (bei HLA-A*01⁺ Patienten) und CMVpp65 stimuliert wurden, lagen mit 0% bis 0,12% im Bereich der unstimulierten Proben.

4.2.7 Charakterisierung der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Für die detaillierte Untersuchung der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden unterschiedliche Verfahren eingesetzt. Aufschlussreiche Ergebnisse wurden über eine phänotypische Charakterisierung mit tetramerisierten, Peptid-beladenen MHC-I-Molekülen kombiniert mit funktionellen Analysen wie der intrazellulären Zytokin-Färbung und Zytotoxizitätsversuchen erzielt. Grundsätzlich liefern diese Verfahren unterschiedliche Informationen. Die Färbung mit tetrameren MHC-Molekülen identifiziert alle CD8⁺ T-Zellen, deren T-Zellrezeptor für den eingesetzten MHC-Peptid-Komplex spezifisch ist, liefert aber keine Informationen über die Funktionalität dieser Zellen. Im Gegensatz dazu werden mit der intrazellulären IFN γ -Färbung nur die T-Zellen erfasst, die funktionell intakt sind und nach spezifischer Stimulation mit Peptiden IFN γ produzieren können.

Die zytotoxische Aktivität der Tumor-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde in ⁵¹Cr-Freisetzungsversuchen gemessen. Für diese Untersuchungen wurden nur Proben von Patienten berücksichtigt, die in den Frequenzanalysen eine hohe Anzahl an Peptid-

spezifischen Zellen aufwiesen und somit eine statistisch relevante Aussage über die Eigenschaften dieser Zellen lieferten.

4.2.7.1 Färbung mit tetrameren MHC-Molekülen und intrazelluläre IFN γ -Messung

Mit der MHC-Tetramer-Färbung werden unabhängig von ihrer Reaktionsfähigkeit diejenigen T-Zellen nachgewiesen, die eine Spezifität für ein bestimmtes Antigen besitzen. Somit werden auch Zellen, die aufgrund von Anergie, Toleranz, Suppression oder Defekten im Signaltransduktionsweg keine funktionelle Kapazität besitzen, detektiert. Die Funktionalität der Tetramer-spezifischen Zellen wurde nach Stimulation mit dem entsprechenden Peptid mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung ermittelt.

Die CD8⁺ T-Zellpopulation wurde, wie in Abbildung 15 dargestellt, eingegrenzt und nur diese Zellen wurden in die Auswertung einbezogen.

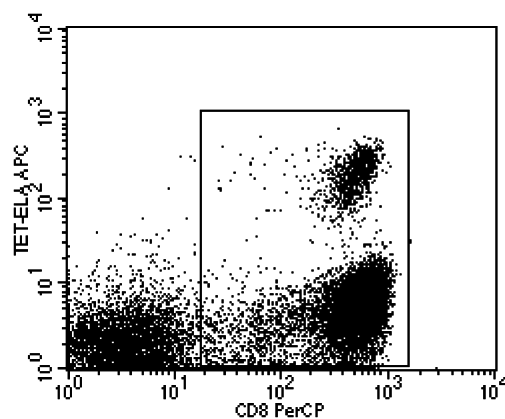


Abbildung 15: Charakterisierung der Lymphozytenpopulation von Patient UTR mit den Markern CD8 und tetrameren MHC-I-Molekülen beladen mit dem Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ (TET-ELA). Die gesamte CD8⁺ T-Zellpopulation wurde für die weitere Charakterisierung eingesetzt.

Durch die Kombination von MHC-Tetrameren und intrazellulärer IFN γ -Färbung wurde die Funktionalität der Tetramer-spezifischen T-Zellen ermittelt. Die Stimulation der Peptid-spezifischen T-Zellen führte zu einer Herunterregulation der T-Zellrezeptoren der aktivierten Zellen, so dass nach Stimulation die Färbung dieser Zellen mit Tetrameren abgeschwächt war (Abbildung 16 B und D). Diese Beobachtung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht (Nielsen et al., 2000; Romero et al, 2000).

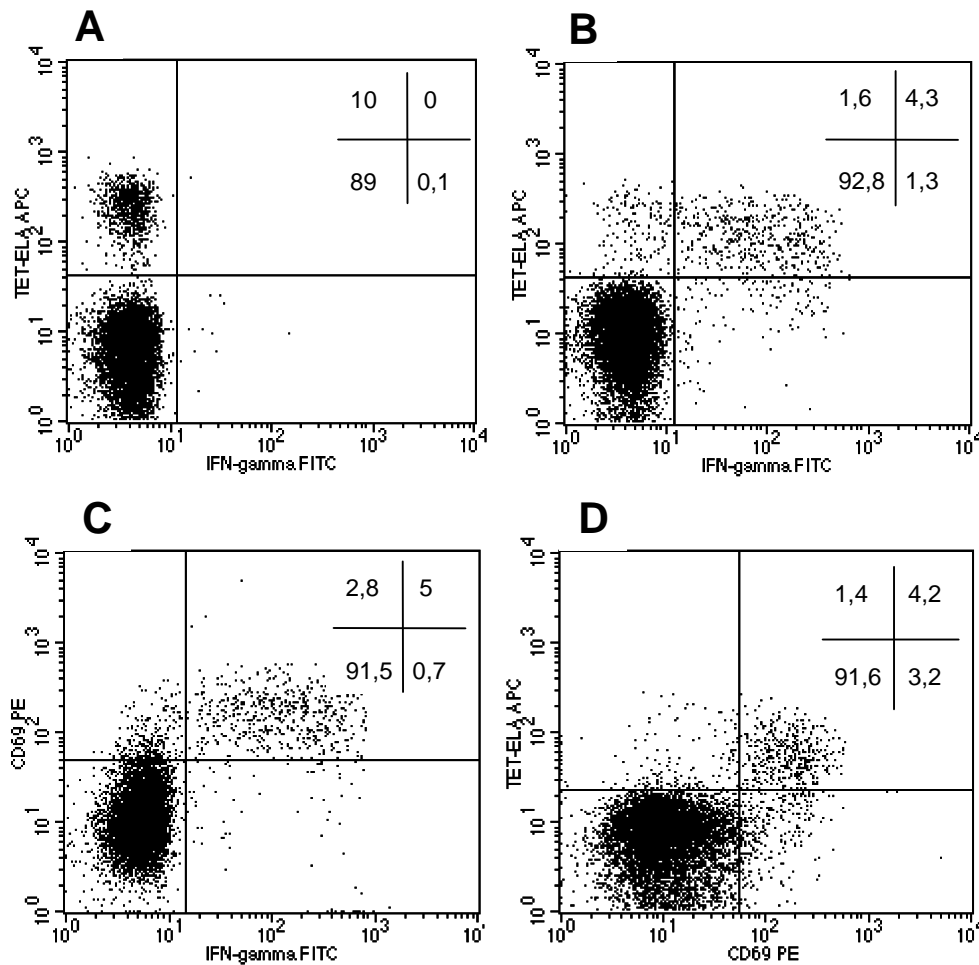


Abbildung 16: CD8⁺ T-Zellen nach kombinierter Färbung anti-CD69, tetrameren MHC-I-Molekülen beladen mit dem Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ (TET-ELA) und intrazellulärer IFN γ -Färbung bei (A) unstimulierten PBMCs und (B-D) bei PBMCs, die mit dem entsprechenden Peptid stimuliert wurden. Oben rechts sind jeweils die Prozentzahlen der Zellen aus den einzelnen Quadranten angegeben. Die Procente beziehen sich auf die gesamte CD8⁺ Population.

Bei Patient UTR wurden in der unstimulierten Probe mit Tetrameren 10% der gesamten CD8⁺ T-Zellen als spezifisch für das Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ identifiziert (Abbildung 16 A). Die Stimulation mit dem Peptid führte zur IFN γ -Produktion in 5,6% der CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 16 B). Das bedeutet, dass mehr als die Hälfte der Peptid-spezifischen Zellen bei diesem Patienten noch die Fähigkeit besaß, auf das Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ zu reagieren. Bei etwa einem Drittel der Peptid-spezifischen T-Zellen wurde der T-Zellrezeptor nach Stimulation herunterreguliert, aber keine IFN γ -Produktion induziert (Abbildung 16 A und B, unterer linker Quadrant im Vergleich). Ein Anteil von 1,6% der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 16 B) reagierten auf die Stimulation nicht mit IFN γ -Produktion. Die Färbung gegen den Aktivierungsmarker CD69 zeigte ein ähnliches Bild (Abbildung 16 C und D). CD69 (Antigen Leu23) ist ein früher Aktivierungsmarker, der von aktivierten Zellen bereits 30 min nach Stimulation exprimiert wird (Lopez-Cabrera et al. 1993; Nylander & Kalies, 1999). Die Funktion dieses Oberflächenmarkers ist noch nicht bekannt. Es exprimieren 7,8% der CD8⁺ T-Zellen den Aktivierungsmarker CD69 nach Stimulation, insgesamt 5% der CD8⁺ Zellen produzieren IFN γ (Abbildung 16 C). Etwa 75% der TAA-spezifischen T-Zellen exprimierten den Aktivierungsmarker CD69 nach Stimulation mit dem spezifischen Peptid, aber nur 50% produzieren auch gleichzeitig IFN γ (nach Eingrenzen auf die MHC-Tetramer-positiven CD8⁺-T-Zellen, Daten nicht gezeigt). Folglich exprimierten ca. 25% der TAA-spezifischen T-Zellen CD69 nach Aktivierung, waren aber nicht in der Lage, IFN γ zu produzieren.

4.2.7.2 Charakterisierung TAA-spezifischer/IFN γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen mittels verschiedener Oberflächenmarker

Für die weitere Charakterisierung der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden unterschiedliche Oberflächenmoleküle gefärbt, die Aufschluss über den Phänotyp dieser Zellen geben. Diese Marker sind in Tabelle 7 zusammengefasst, ihre Funktion ist kurz beschrieben.

Tabelle 7: Zusammenstellung der Oberflächenantigene für die Charakterisierung Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

Oberflächen- antigen	<i>Funktion</i>	Einordnung
Differenzierungsmarker		
CD45RA	Regulation der Aktivierung, Dephos. u. Aktivierung von Tyrosin-Kinasen	Expression auf T-Zellen vor Antigen-Kontakt, <i>naiv</i>
CD45RO	Regulation der Aktivierung, Dephos. u. Aktivierung von Tyrosin-Kinasen	Expression auf T-Zellen nach Antigen-Kontakt, <i>memory</i>
CD28	Kostimulatorisches Signal, Bindung an CD80 und CD86	Expression auf T-Zellen, notw. für primäre Aktivierung
CD27	T-Zell-T-Zellinteraktion, Bindung an CD70	Expression auf Effektor-T-Zellen
Aktivierungszustand		
CD44	Bindung an Adhäsionsmoleküle, Migration	Expression auf aktivierten T-Zellen
NK-/NKT-Zell-Marker		
KIRs	Rezeptoren mit inhibitorischer Wirkung auf zytolytische Aktivität	Express. auf Übergangsformen von T- und NK-Zellen
CD56	Nicht bekannt	NK-Zellmarker
CD16	Nicht bekannt	NK-Zellmarker
CD57	Zell-Zell-Kontakt	NK-Zellmarker
Anergie		
CD3 ζ	CD3 ζ -Verlust korreliert mit anergischen Zellen	Anzahl auf anergisierten Zellen verringert

Diese detaillierten Untersuchungen wurden bei Patient UTR vorgenommen. Bei diesem Patienten waren hohe Frequenzen an Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ und Melan A/MART-1₂₇₋₃₅-spezifischen T-Zellen mittels IFN γ -Färbung identifiziert worden, welche Voraussetzung für weiterführende Analysen waren. Für beide Epitope wurden spezifische T-Zellen sowohl mit funktioneller Kapazität als auch mit fehlender Reaktionsfähigkeit gefunden, so dass im Folgenden vier verschiedene Populationen an spezifischen Zellen bezüglich ihrer Expression der zuvor genannten Marker untersucht wurden. Die Ergebnisse für Melan A/MART-1₂₇₋₃₅-spezifische T-Zellen sind exemplarisch für drei Marker in Abbildung 17 dargestellt und in Tabelle 8 für beide Spezifitäten zusammengefasst.

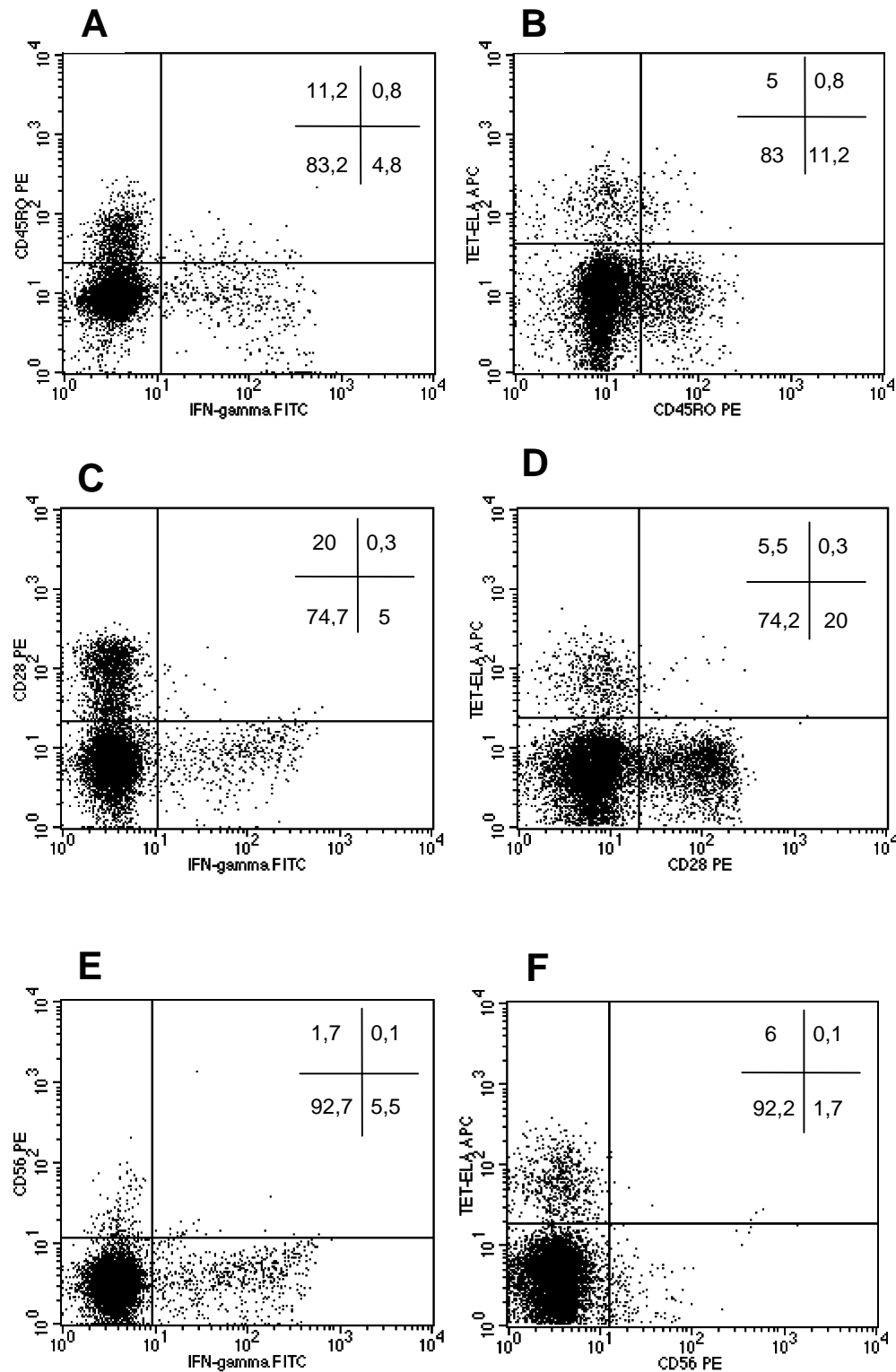


Abbildung 17: CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit dem Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ und intrazellulärer IFN γ -Färbung. Die Zellen wurden zusätzlich mit Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ beladenen tetrameren MHC-I-Molekülen (TET-ELA) und mit (A-B) anti-CD45RO, (C-D) anti-CD28 und (E-F) anti-CD56 gefärbt. Oben rechts sind jeweils die Prozentzahlen der Zellen aus den einzelnen Quadranten angegeben. Die Procente beziehen sich auf die gesamte CD8⁺ Population.

Sowohl die $\text{IFN}\gamma^+/\text{Tetramer}^+$ positiven T-Zellen als auch die $\text{IFN}\gamma^-/\text{Tetramer}^+$ T-Zellen exprimieren den Marker CD45RO nicht. Nur 0,8% der gesamten CD8^+ T-Zellen waren sowohl positiv für CD45RO als auch für das MHC-Tetramer (Abbildung 17 B). Für den CD28 Marker ergab sich ein ähnliches Bild. Bis auf 0,3% waren alle MHC-Tetramer^+ , CD8^+ T-Zellen für CD28 negativ (Abbildung 17 D). Die sequentielle Analyse durch Eingrenzen der Tetramer^+ -Population ergab, dass eine geringe Anzahl dieser Zellen (2,5%) CD28 exprimierten, aber kein $\text{IFN}\gamma$ produzieren konnten ($\text{IFN}\gamma^-/\text{Tetramer}^+$). Im Gegensatz dazu wurde CD28 von der $\text{IFN}\gamma^+/\text{Tetramer}^+$ Population nicht exprimiert. Die Färbungen mit dem CD45RA Marker zeigten, dass 35% der $\text{IFN}\gamma^+/\text{Tetramer}^+$ T-Zellen diesen Marker exprimierten (Daten nicht gezeigt). Die $\text{IFN}\gamma^+/\text{Tetramer}^+$ T-Zellen weisen demnach einen $\text{CD45RO}^-/\text{CD28}^-$ und zu 35% einen CD45RA positiven Phänotyp auf. Der $\text{CD8}^+/\text{CD28}^-/\text{CD45RO}^-/\text{CD45RA}^+$ T-Zellphänotyp ist nach neuesten Erkenntnissen bei antigen-spezifischen T-Zellen im Effektorstadium vorzufinden (Valmori et al., 2002). Zellen mit diesem Phänotyp weisen durch die Expression von Perforin sowie Granzym A und B ein hohes zytolytisches Potential auf (Hamann et al., 1999). Weder die $\text{IFN}\gamma^+/\text{Tetramer}^+$ Zellen, noch die $\text{IFN}\gamma^-/\text{Tetramer}^+$ zeigten eine Expression des NK-Zellmarkers CD56 Markers (Abbildung 17 E und F).

Die gleichen Messungen wurden bei Patient UTR auch mit tetrameren MHC-I-Molekülen beladen mit dem Peptid Melan A/MART-1₂₇₋₃₅, durchgeführt. Ähnlich wie die Melan A/MART-1₂₆₋₃₅-spezifischen T-Zellen zeigten die $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Melan A/MART-1₂₇₋₃₅-spezifischen Zellen einen $\text{CD8}^+/\text{CD28}^-/\text{CD45RO}^-$ Phänotyp. Es wurde ebenfalls eine Herunterregulation des T-Zellrezeptors nach Stimulation mit dem Peptid Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ beobachtet (Abbildung 18). Es waren 11% der CD8^+ T-Zellen positiv für die Melan A/MART-1₂₇₋₃₅-beladenen tetrameren MHC-I-Moleküle. Nach Stimulation mit dem entsprechenden Peptid reduzierte sich die Frequenz der Tetramer-spezifischen T-Zellen auf 7,3%.

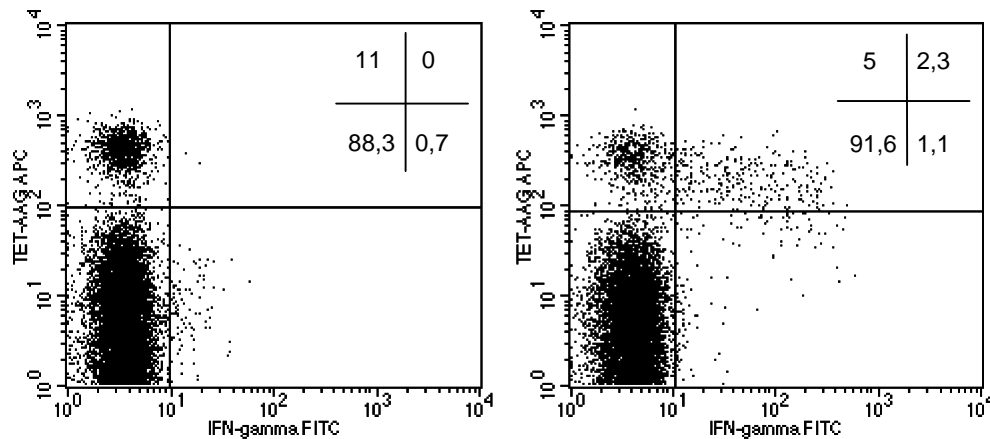


Abbildung 18: CD8⁺ T-Zellen nach Färbung mit tetrameren MHC-I-Molekülen beladen mit dem Peptid Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ (TET-AAG) bei unstimulierten PBMCs (links) und bei PBMCs, die mit dem entsprechenden Peptid stimuliert wurden (rechts). Oben rechts sind jeweils die Prozentzahlen der Zellen aus den einzelnen Quadranten angegeben. Die Prozente beziehen sich auf die gesamte CD8⁺ Population.

Im Gegensatz zu der Stimulation mit dem Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ reagierten auf das Peptid Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ nur 3,4% der gesamten CD8⁺ Zellen mit IFN γ -Produktion (Abbildung 18). Dementsprechend waren insgesamt nur noch 20% der Melan A/MART-1₂₇₋₃₅-spezifischen Zellen in der Lage, auf dieses Peptid zu reagieren. Sowohl die IFN γ ⁺/Tetramer⁺ Zellen als auch die IFN γ ⁻/Tetramer⁺ Zellen exprimierten zu 38% den CD45RA Marker. Hingegen waren nur 1,1% der Tetramer⁺CD8⁺ T-Zellen auch positiv für den Marker CD45RO und exprimierten gleichzeitig IFN γ nach Stimulation mit dem Peptid. Die IFN γ ⁻/Tetramer⁺ Zellpopulation exprimierte zu 2,8% diesen Marker.

Nach der sequentiellen Analyse der CD8-Subpopulationen zeigte sich, dass die doppelt positiven IFN γ ⁺/Tetramer⁺ Zellen CD28 nicht exprimierten, während die IFN γ ⁻/Tetramer⁺ Zellen diesen Marker zu 2,2% exprimierten. Für den NK-Zellmarker CD56 waren sowohl die IFN γ ⁺/Tetramer⁺ Zellen als auch die IFN γ ⁻/Tetramer⁺ Zellen negativ. Die gesamte IFN γ ⁺/Tetramer⁺ Zellpopulation exprimierte den Aktivierungsmarker CD69, während die IFN γ ⁻/Tetramer⁺ Zellen diesen Marker nur zu 60% exprimierten.

Die CD3-zeta Kette des T-Zellrezeptors spielt eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung während der Aktivierung der T-Zelle. Eine geringe oder fehlende Expression dieser Kette führt zu einer unvollständigen Aktivierung der antigenspezifischen T-Zellen und verhindert somit die zytotoxische Lyse der Zielzelle (Reichert et al., 1998). Von 45% der CD8⁺ Lymphozyten wurde CD3-zeta auf einem intermediären Niveau exprimiert und von 20% auf

einem hohen Niveau, während die restlichen 35% negativ für diesen Marker waren. Alle IFN γ ⁺/Tetramer⁺ Zellen exprimierten CD3-zeta in einem intermediären Bereich.

Die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung der Melan A/MART-1₂₆₋₃₅⁻ und der Melan A/MART-1₂₇₋₃₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Charakterisierung der CD8⁺ T-Zellen von Pat. UTR spezifisch für die Peptide Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ und Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker mittels FACS-Analyse nach spezifischer Peptidstimulation. Quantifizierung der entsprechenden CD8⁺ Subpopulationen: -, 0-2%; -/+, 2-20%; +, 20-40%; ++, 40-60%; +++, 60-80%; +++++, 80-100%, ND: nicht durchgeführt.

Antigen	Melan A/MART-1 ₂₆₋₃₅		Melan A/MART-1 ₂₇₋₃₅	
	IFN γ ⁺ /TET ⁺	IFN γ ⁻ /TET ⁺	IFN γ ⁺ /TET ⁺	IFN γ ⁻ /TET ⁺
Linienmarker				
CD3	++++	++++	++++	++++
CD8	+++	+++	+++	+++
CD56	-	-	-	-
CD16	-	-	ND	-
Differenzierungs- Marker				
CD28	-	-/+	-	-/+
CD45RA	+	+	+	+
CD45RO	-	-/+	-/+	-/+
CD44	+++	+++	+++	+++
Aktivierungsmarker				
IFN γ	++++	-	++++	-
CD69	++++	-/+	++++	++
Funktionsmarker				
CD3zeta	+	+	+	+

Für die IFN γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen nach Peptidstimulation ergab sich bei Patient NRO bezüglich der in Tabelle 8 aufgeführten Marker ein ähnliches Expressionsmuster wie bei Patient UTR. Es konnten allerdings keine Messungen mit Peptid-beladenen tetrameren MHC-I-Molekülen vorgenommen werden.

Um das Differenzierungsstadium der reaktiven Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen der Patienten UTR und NRO genauer zu charakterisieren, wurde die Expression der Marker CD27, CD57, CD25, CD71 und Perforin untersucht. T-Zellen verlieren im Laufe ihrer Differenzierung erst den CD28- und danach den CD27-Marker (Hamann et al., 1999; Valmori et al., 2002). CD27 spielt eine Rolle im T-Zell-T-Zellkontakt nach Aktivierung. Spezifische enddifferenzierte Effektor-T-Zellen exprimieren den NK-Zellmarker CD57 (Mingari et al., 1996). Die genaue Funktion des CD57-Moleküls ist noch nicht bekannt. Die Ergebnisse der FACS-Analysen für Patient UTR bezüglich dieser Marker sind in Abbildung 19 gezeigt.

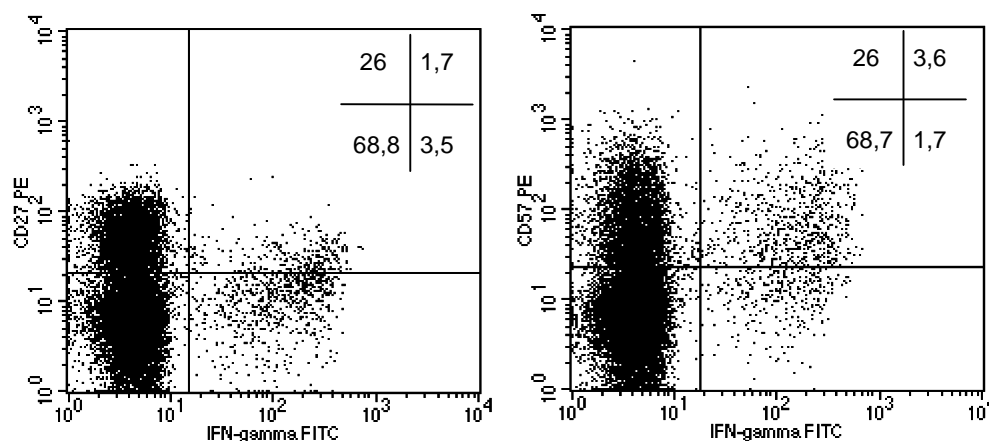


Abbildung 19: Charakterisierung der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen von Patient UTR bezüglich der Marker CD27 und CD57. Die Zellen wurden 5,5 h mit dem Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ unter Zugabe von BFA stimuliert und auf intrazelluläre IFN γ -Produktion untersucht.

Insgesamt exprimierten bei Patient UTR 27,7% und bei Patient NRO 24% (Daten nicht gezeigt) der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen den Marker CD27. Sowohl bei Patient UTR als auch bei Patient NRO waren nur 1,7% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen durch eine Expression des Markers CD27 und gleichzeitige der IFN γ -Produktion gekennzeichnet. Bezogen auf die IFN γ -produzierende Zellpopulation, exprimierten 32% der Zellen CD27. Der Marker CD57 wurde bei Patient UTR von insgesamt 29,6% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen exprimiert, 3,6% produzierten gleichzeitig IFN γ nach Peptidstimulation und waren CD57 positiv. Bezogen auf die gesamte IFN γ -produzierende T-Zellpopulation ist das ein Anteil von annähernd 70%.

Für den Transferrinrezeptor CD71, der auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, waren nach Peptidstimulation sowohl bei Patient UTR als auch bei Patient NRO alle IFN γ -produzierenden Zellen positiv. Der hoch affine IL-2-Rezeptor CD25 wurde von den IFN γ -produzierenden Zellen größtenteils nicht exprimiert. Bei Patient UTR waren in der unstimulierten Probe 0,6% der CD8 $^{+}$ T-Zellen positiv für CD25. Nach Stimulation mit dem Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ wurde ein Anstieg dieser Zellen auf 1,5% beobachtet, jedoch konnten nur 0,12% der CD8 $^{+}$ T-Zellen auch gleichzeitig IFN γ produzieren. Bei Patient NRO lag die Anzahl der CD8 $^{+}$ T-Zellen, die CD25 und gleichzeitig IFN γ nach Peptidstimulation produzierten bei 0,07%.

Um nachzuweisen, ob die Peptid-spezifischen CD8 $^{+}$ T-Zellen über zytotoxisches Potential verfügen, wurde der Perforingehalt der IFN γ -produzierenden Zellen gemessen. Sowohl bei Patient UTR als auch bei Patient NRO konnte nach Peptidstimulation Perforin intrazellulär detektiert werden (Abbildung 20). Die Proliferationsfähigkeit der Peptid-spezifischen CD8 $^{+}$ T-Zellen wurde mit mAK gegen das Proliferations-assoziierte Zellkern-Antigen Ki-67 gemessen (Kubbutat et al, 1994). Dieses Antigen wird in allen aktiven Stadien des Zellzyklus exprimiert (Abbildung 20).

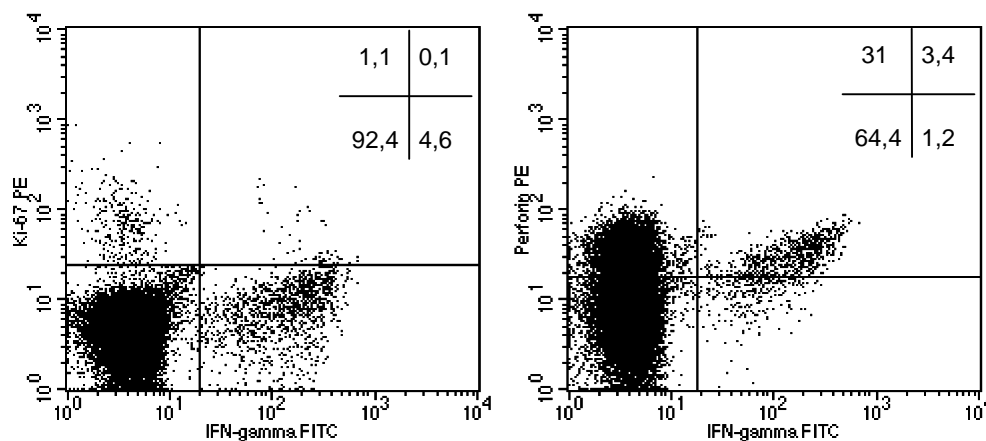


Abbildung 20: Charakterisierung der CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ T-Zellen von Patient UTR bezüglich der Marker Ki-67 und Perforin. Die Zellen wurden 5,5 h mit dem Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ unter Zugabe von BFA stimuliert und auf intrazelluläre IFN γ -Produktion untersucht. Die Prozentzahlen in den einzelnen Quadranten beziehen sich auf die gesamte CD8 $^{+}$ T-Zellpopulation.

Die Ergebnisse dieser Messungen zeigen, dass bei Patient UTR insgesamt 1,2% der CD8 $^{+}$ T-Zellen den Proliferationsmarker Ki-67 exprimierten. Dagegen exprimierten nur 0,1% der Tumor-spezifischen IFN γ $^{+}$ /CD8 $^{+}$ T-Zellen diesen Marker. Ein ähnliches Bild wurde auch bei

Patient NRO beobachtet. Insgesamt waren 1,5% der CD8⁺ Zellen positiv für diesen Marker, jedoch produzierten nur 0,05% zusätzlich auch IFN γ nach Peptidstimulation.

Charakteristisch für funktionell intakte zytotoxische T-Zellen ist ein hoher Perforingehalt. Perforin wird nach der Stimulation der T-Zellen ausgeschüttet und lagert sich in die Membran von Zielzellen. Durch die hierdurch ausgebildeten Poren dringen zytotoxische Substanzen, wie z.B. Granzym und schädigen die Zielzellen. Sowohl bei Patient UTR als auch bei Patient NRO zeigten die Zellen, die auf das Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ spezifisch mit IFN γ -Produktion reagierten, einen hohen Perforingehalt. Durch die Stimulation unter Zugabe von BFA wurde die Ausschüttung von Perforin verhindert und dieses anschließend intrazellulär gemessen. Bei Patient UTR waren 34,4% und bei Patient NRO 12% der CD8⁺ T-Zellen positiv für Perforin. Innerhalb der IFN γ -produzierenden Zellpopulation zeigten bei Patient UTR 70,3% der Zellen auch eine Perforinexpression. Bei Patient NRO waren 72,9% der IFN γ -produzierenden T-Zellen auch Perforin-positiv.

4.2.7.3 Charakterisierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Kurzzeit-Kultivierung

Um die Effekte der Zellkultur auf die Expression unterschiedlicher Marker zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Messungen mit frisch isolierten Lymphozyten und Zellen aus Lymphozytenkulturen durchgeführt.

Es wurden isolierte PBMCs von Patient UTR mit dem Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ oder Melan A/MART-1₂₇₋₃₅ unter Zusatz von IL-2 für 5-7 Tage kultiviert. Bei Patient NRO wurden antigenspezifische T-Zelllinien gegen das Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ generiert, da solche Zellen in einer höheren Frequenz nachgewiesen worden sind. Nach 5-7 Tagen wurden die Kulturen mittels Peptid-beladener tetramerer MHC-I-Moleküle auf ihre Spezifität im Durchflusszytometer untersucht. Es zeigte sich, dass 70-95% der CD8⁺ T-Zellen nach Kultivierung mit den Peptiden positiv für das entsprechende Tetramer waren. Durch die Kultivierung mit IL-2 konnte für die Zellen beider Patienten ein *shift* vom CD45RA zum CD45RO Phänotyp beobachtet werden. In frisch isolierten PBMCs wurden keine CD45RO positiven Peptid-spezifischen Zellen detektiert. Des Weiteren waren die Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den verschiedenen Kulturen zwischen 3-12% für CD25 positiv. Für den Marker CD44 waren nach Kultivierung bei beiden Patienten alle Peptid-spezifischen T-Zellen positiv.

Verglichen mit frischen Lymphozyten aus dem peripheren Blut ist ein deutlicher Unterschied im Expressionsmuster der einzelnen Marker nach Kultivierung mit IL-2 für 5-7 Tage

festzustellen. Eine Beeinflussung der funktionellen Kapazität und Zytotoxizität dieser Zellen durch die Kulturbedingungen ist nicht auszuschließen.

4.2.7.4 Untersuchung der Expression von killer inhibitory receptors auf TAA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

An der Regulation der zytotoxischen Aktivität von T- und NK-Zellen sind so genannte *killer inhibitory receptors* (KIR) beteiligt (Mingari *et al*, 1998; Bakker *et al*, 1998; Baars *et al*, 2000).

Die KIRs werden neben NK-Zellen auch auf Subpopulationen von $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert. Die über den Antigenkontakt vermittelte zytotoxische Reaktion wird durch die Bindung der KIRs an MHC-I-Allele auf der Zielzelle inhibiert (Ferrini *et al*, 1994). Unterschiedliche HLA-Allele werden hierbei von verschiedenen KIRs erkannt. CD158a (p58.1 Molekül) ist ein KI-Rezeptor auf NK-Zellen und auf einer Subpopulation von $\alpha\beta$ -T-Zellen. Dieser Rezeptor erkennt die HLA-C-Allele Cw4, Cw2, Cw5 und Cw6 und verhindert nach Bindung an eines dieser Allele die Auslösung eines Aktivierungs-Signals in der T-Zelle. Der KI-Rezeptor p58.2 (CD158b) reguliert die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und einer Subpopulation von T-Zellen durch die Interaktion mit den HLA-C-Allelen Cw1, Cw3, Cw7 und Cw8 (Kim *et al*, 1997). Der KI-Rezeptor Kp43 (CD94) reguliert die Aktivität von NK-Zellen und T-Zellen durch die Bindung an unterschiedliche HLA-E-Allele (Moretta *et al*, 1994). Das Antigen KIR-NKAT2 erkennt die HLA-C Allele Cw3, Cw1, Cw7 und Cw8. Der KI-Rezeptor NKB1 hemmt durch die Bindung an die HLA-B-Moleküle Bw4 die durch den T-Zellrezeptor-Antigen-Komplex induzierte Aktivierung der T-Zelle und allgemein die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen (Gumperz *et al*, 1995).

Aberante Zellen wie Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen haben oft eine geringere oder fehlende Expression an MHC-I-Molekülen und können somit leichter von NK-Zellen lysiert werden.

Um festzustellen, ob die Peptid-spezifischen T-Zellen diese Rezeptoren exprimieren und somit trotz IFN γ -Produktion nach Peptidstimulation eine Lyse der Zielzelle möglicherweise verhindert werden kann, wurden die entsprechenden Marker bei Patient UTR und NRO untersucht. Entsprechend des HLA-Typus wurde bei Patient UTR (HLA-Typ: A2, A11; B35(Bw6), B60(40)(Bw6); Cw3, Cw4 DR1, DR8; DR52; DQ1) die Expression der KIRs CD158a, CD158b, CD94 und NKAT2 untersucht. Bei Patient NRO (HLA-Typ: A2, A24(9); B44(12)(Bw4), B57(17)(Bw4); Cw5, Cw6, DR7, DR11(5); DR53; DQ2, DQ7(DQ3)) wurden die Marker CD158b, NKB1 und CD94 untersucht.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen für die KI-Rezeptoren sind exemplarisch für Patient UTR in Abbildung 21 dargestellt. Die Peptid-spezifische CD8⁺ T-

Zellpopulation wurde mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung nach Stimulation mit dem Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ Peptid ermittelt.

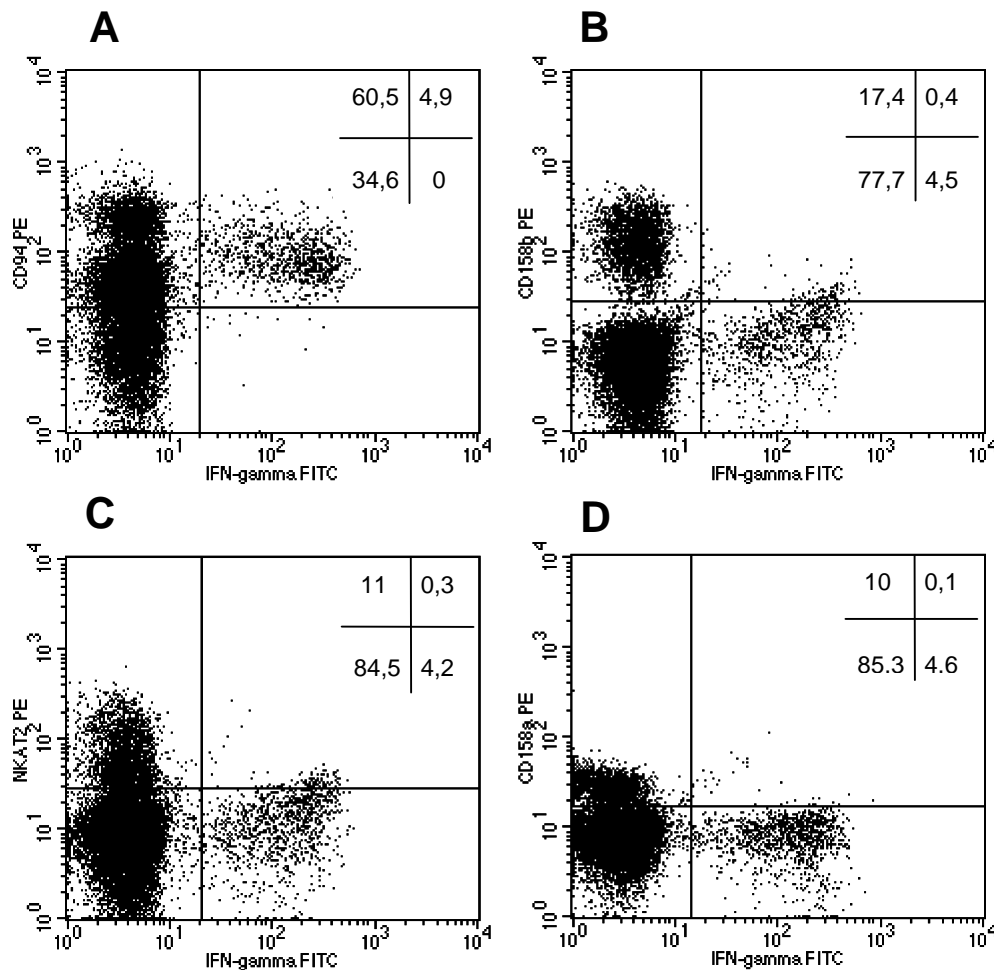


Abbildung 21: Charakterisierung der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen von Patient UTR bezüglich der KIR-Moleküle CD94 (A), CD158b (B), NKAT2 (C) und CD158a (D). Die Zellen wurden 5,5 h mit dem Peptid Melan A/MART-1₂₆₋₃₅ unter Zugabe von BFA stimuliert und auf intrazelluläre IFN γ -Produktion untersucht.

Diese Messungen bei Patient UTR zeigen, dass abgesehen von CD94 (4,9%) keiner der KIR-Rezeptoren in nennenswertem Maße von den Peptid-spezifischen, IFN γ -produzierenden T-Zellen exprimiert wurde. Insgesamt exprimierten 65,4% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen den Rezeptor CD94. Die Peptid-spezifischen T-Zellen waren nach der intrazellulären Färbung zu annähernd 100% positiv für CD94. Den Marker CD158b exprimierten insgesamt 17,8% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen. Nur 0,4% dieser Zellen exprimierten CD158b und IFN γ nach Peptidstimulation. Bei manchen Messungen wurde in der 4. Fluoreszenz anstelle von CD3 der NK-Zellmarker CD16 untersucht. Diese FACS-Analysen ergaben, dass die CD158b positiven Zellen zu 30% CD16⁺ NK-Zellen und zu 70% CD8⁺ T-Zellen waren. Des Weiteren

wurde der KI-Rezeptor NKAT2 mit Ausnahme eines geringen Prozentsatzes (0,3%) von den IFN γ -produzierenden Zellen nicht exprimiert. Insgesamt wurde dieser Marker von 11,3% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen exprimiert. 10% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen exprimierten CD158a auf einem niedrigen Niveau. Die Mehrheit der IFN γ -produzierenden T-Zellen exprimierte diesen Marker nicht. Die zusätzlichen Messungen mit dem NK-Zellmarker CD16 zeigten, dass 15% der NK-Zellen positiv für diesen Marker waren.

Bei Patient NRO zeigten die Melan A/MART-1₂₆₋₃₅-spezifischen IFN γ ⁺ T- Zellen ebenfalls keine Expression des CD158a KI-Rezeptors. Den NKB1 Marker exprimierten insgesamt 8,9% der Zellen aus der Lymphozytenpopulation. Von den CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen waren 2% der Zellen positiv für NKB1. Die IFN γ -produzierenden T-Zellen waren negativ bezüglich dieses Markers. Den Rezeptor CD94 exprimierten 25% der gesamten Lymphozyten. Innerhalb dieser Population exprimierten die CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen zu 38% diesen Marker. Die IFN γ -produzierenden T-Zellen waren intrazellulär zu 100% positiv für diesen Marker. 9% der Lymphozyten exprimierten bei diesem Patienten den KI-Rezeptor CD158b. Die CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen waren zu 6,7% positiv für diesen Marker. 2,3% der CD158b-exprimierenden Zellen waren CD16 positiv. Die Melan A/MART-1₂₆₋₃₅-spezifischen IFN γ -produzierenden Zellen exprimierten diesen Marker nicht.

Die Analyse der Expression der KIRs zeigte, dass die Peptid-spezifischen IFN γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen für diese Marker größten Teils negativ sind. Eine inhibitorische Wirkung in der T-Zellaktivität könnte lediglich durch den CD94 KI-Rezeptor, den diese Zellen zu 100% exprimieren, verursacht werden.

4.2.8 Zytotoxische Aktivität der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Die Fähigkeit der Tumor-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zur Lyse von Zielzellen, die das entsprechende Tumor-assoziierte T-Zellepitop auf ihrer Oberfläche präsentieren, wurde in ⁵¹Chromfreisetzungsversuchen untersucht. Diese Versuche wurden ebenfalls nur bei den Patienten mit hohen Frequenzen an Peptid-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut oder Tumor durchgeführt. Die Peptid-spezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut der Patienten NRO und UTR wurden mittels MACS-Technik aus PBMCs isoliert und direkt als Effektorzellen eingesetzt. Zugleich wurden auch Antigen-spezifische T-Zelllinien und soweit möglich aus Lymphozytenkulturen gewonnene oder Tumor-infiltrierende Lymphozyten aus Tumorgewebe eingesetzt. Als Zielzellen für die Peptid-spezifische Lyse wurden T2-Zellen, mit und ohne Peptid, und die NK-sensitive Zelllinie K562 verwendet. Die Ergebnisse der

51 Chromfreisetzungsversuche bei Patient NRO sind in Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellt.

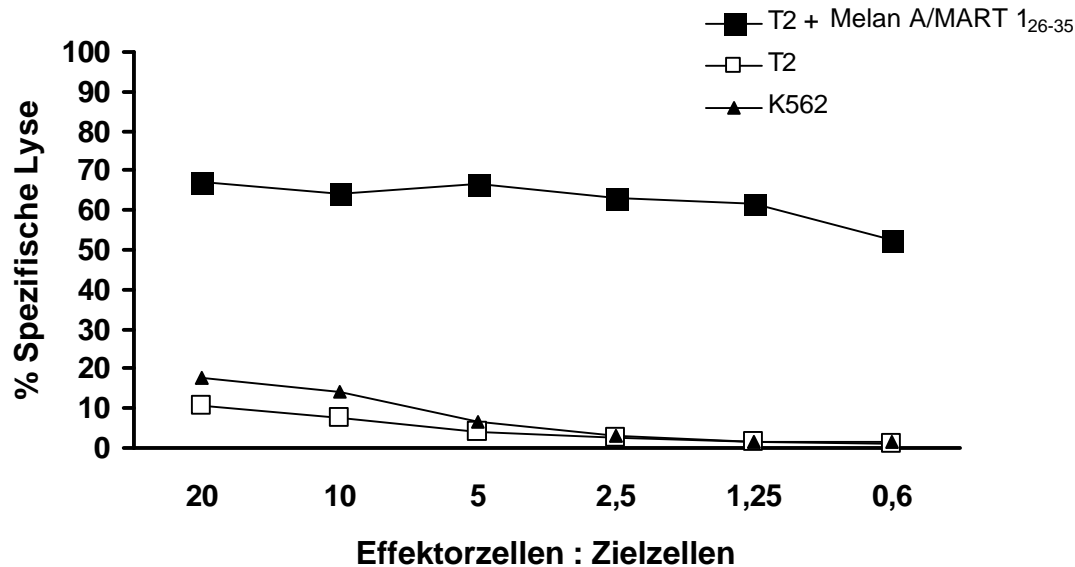


Abbildung 22: Bestimmung der spezifischen Lyse mittels 51 Chromfreisetzungsversuch bei Patient NRO. Als Effektorzellen wurden aus dem peripheren Blut isolierte Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ spezifische CD8⁺ T-Zellen in den auf der x-Achse angegebenen Verhältnissen eingesetzt. Die verwendeten Zielzellen sind in der Legende angegeben.

Die Melan A/MART 1₂₆₋₃₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, die mittels MACS-Technik anhand ihrer spezifischen IFN γ -Produktion nach Peptidstimulation aus PBMCs isoliert wurden, zeigten eine hohe spezifische Lyse von Peptid-beladenen T2 Zellen. Bei einem Verhältnis von 20 Effektorzellen pro Zielzelle lag die spezifische Lyse bei 67%. Die hohe lytische Kapazität verringerte sich nur geringfügig bei niedrigeren Effektor-Zielzell-Verhältnissen. Bei 0,6 Effektorzellen : 1 Zielzelle betrug die spezifische Lyse immer noch 53%. Daraus lässt sich schließen, dass eine stark aktivierte Effektorzelle mehrere Zielzellen lysieren kann. Diese Ergebnisse wurden mit Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, die nach Isolierung 5 Tage unter Zusatz von IL-2 kultiviert wurden, erzielt. Nach insgesamt 12 Tagen wurde mit diesen Effektorzellen erneut ein 51 Chromfreisetzungsversuch durchgeführt. Auch zu diesem Zeitpunkt lag bei einem Verhältnis von 20 Effektorzellen : 1 Zielzelle die spezifische Lyse bei 70%, verringerte sich aber bei einer Ratio von 0,6 Effektorzellen : 1 Zielzelle auf 20%. Die Lyse der ungepulsten T2 Zellen und der K562 lag bei 20 Effektorzellen : 1 Zielzelle bei 10% bzw. bei 18%. Auch diese Werte verringerten sich auf 3% bzw. 4% nach 12 Tagen Kultur. Die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) zeigten ebenfalls eine hohe zytotoxische Aktivität (Abbildung 23).

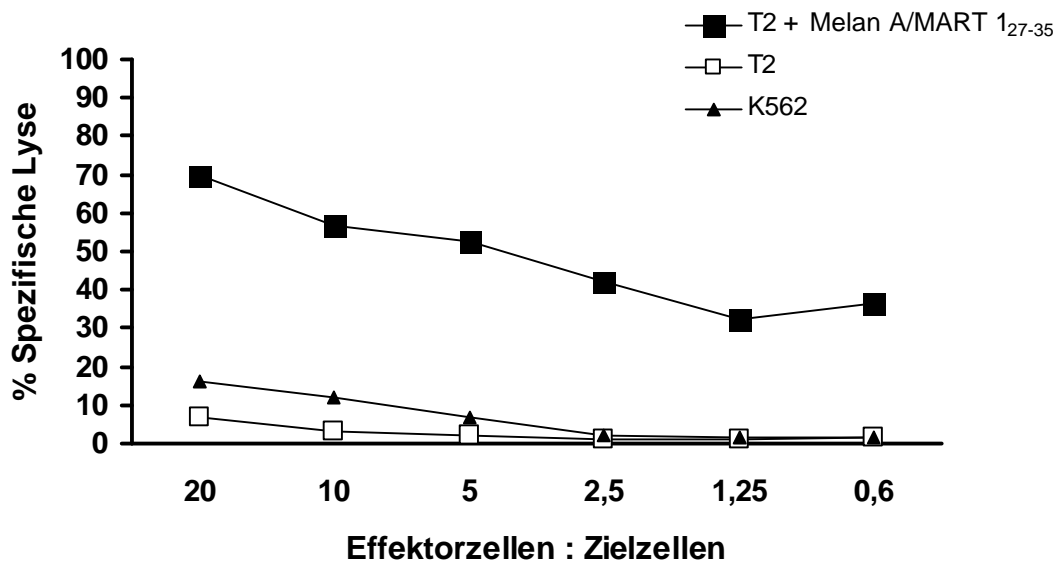
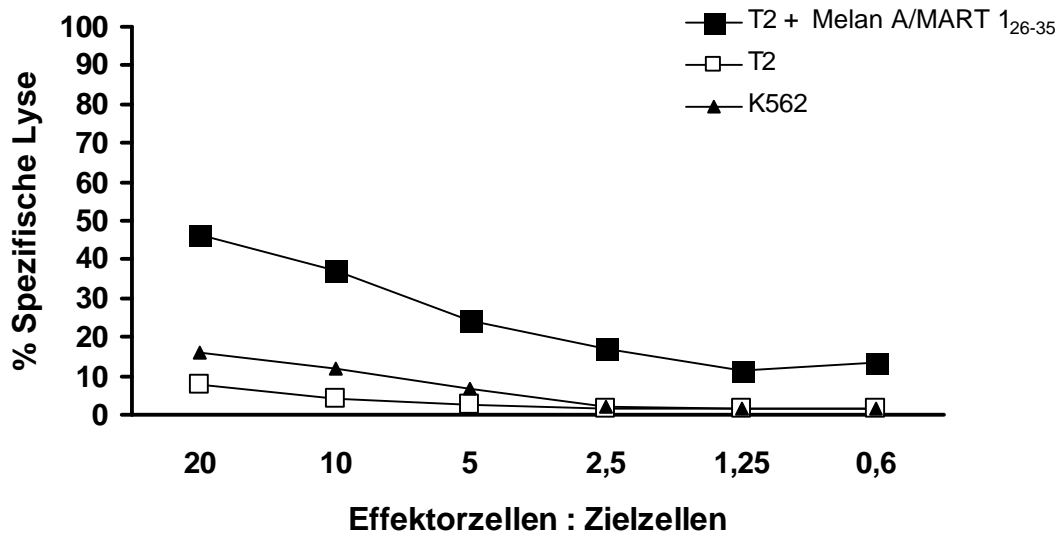


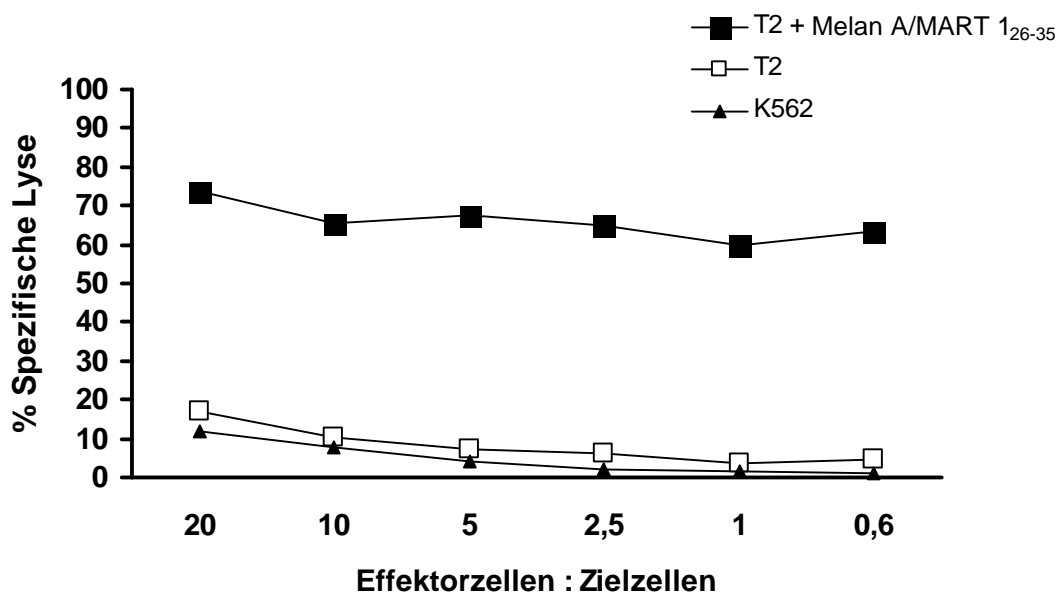
Abbildung 23: Bestimmung der spezifischen Lyse mittels ^{51}Cr Chromfreisetzungsversuch bei Patient NRO. Als Effektorzellen wurden TILs aus Tumorgewebe in den auf der x-Achse angegebenen Verhältnissen eingesetzt. Die verwendeten Zielzellen sind in der Legende angegeben.

Die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten von Patient NRO lysierten sowohl Zielzellen, die mit dem Peptid Melan A/MART $_{126-35}$ beladen wurden, als auch mit Melan A/MART $_{127-35}$ beladene Zellen. Die spezifische Lyse lag bei den Ansätzen mit Melan A/MART $_{126-35}$ beladenen T2 Zellen bei 46%. Beim gleichen Effektor-Zielzell-Verhältnis lag die Lyse der

nicht beladenen T2-Zellen bei 7% und die der NK-sensitiven K562-Zellen bei 16%. Im Gegensatz dazu wurden die Melan A/MART 1₂₇₋₃₅-beladenen Zielzellen in einem höheren Maße lysiert. Bei einer Ratio von 20 Effektorzellen : 1 Zielzelle lag die spezifische Lyse bei 70%. Bei diesem Verhältnis wurden 8% der unbeladenen T2 Zellen und 18% der K562 Zellen lysiert.

Bei Patient UTR konnten sowohl Melan A/MART 1₂₆₋₃₅- als auch Melan A/MART 1₂₇₋₃₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen über MACS-Technik aus dem peripheren Blut isoliert werden. Beide wurden als Effektorzellen im ⁵¹Chromfreisetzungsversuch eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 24 dargestellt.

Auch bei diesem Patienten zeigten die isolierten Peptid-spezifischen T-Zellen nach 5-tägiger Kultur unter Zusatz von IL-2 eine hohe zytotoxische Aktivität. In den Ansätzen mit Melan A/MART 1₂₆₋₃₅-spezifischen T-Zellen lag die spezifische Lyse der Peptid-gepulsten Zielzellen bei 74% und verringerte sich nur geringfügig auf 64% bei der niedrigsten Verdünnung. Für die ungepulsten T2 Zellen und die K562 Zellen wurde eine Lyse von 17% bzw. 12% gemessen. Die Melan A/MART 1₂₇₋₃₅-spezifischen T-Zellen zeigten eine höhere lytische Kapazität. Bei einem Verhältnis von 20 Effektorzellen : 1 Zielzelle wurden 95% der Zielzellen lysiert. Auch bei einer geringen Ratio von Effektorzellen zu Zielzellen (0,6 : 1) betrug die spezifische Lyse 88%. Diese Zellen lysierten mit 70% in hohem Maße auch die ungepulsten T2 Zellen. Die NK-spezifische Lyse von K562-Zellen lag bei einem 20 : 1 Verhältnis bei 17%.



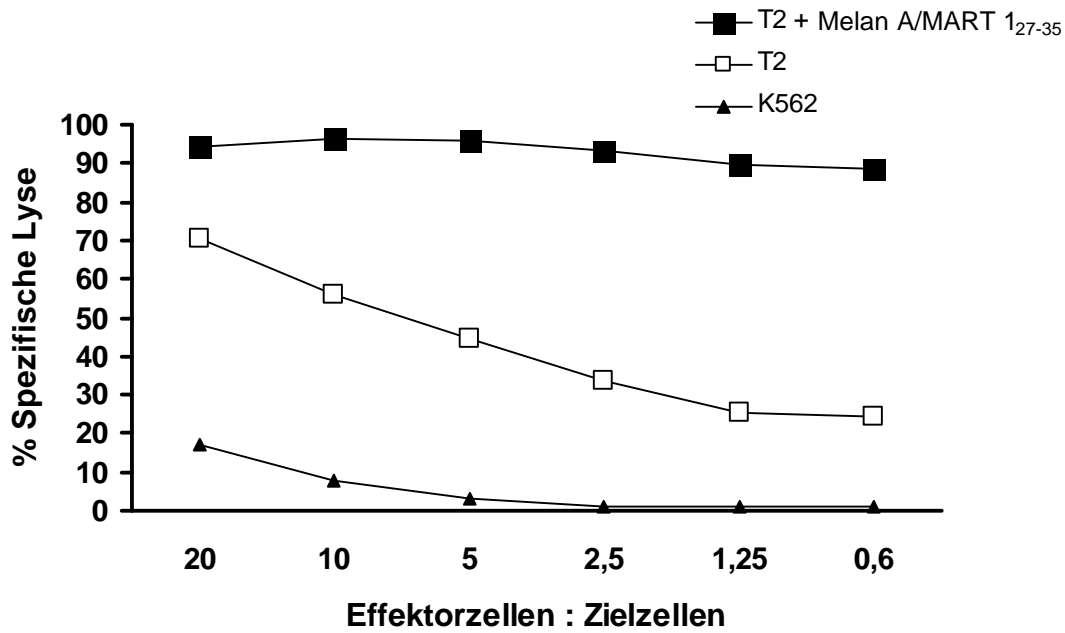


Abbildung 24: Bestimmung der spezifischen Lyse mittels ⁵¹Chromfreisetzungsversuch bei Patient UTR. Als Effektorzellen wurden aus dem peripheren Blut isolierte Melan A/MART 1₂₆₋₃₅⁺ und Melan A/MART 1₂₇₋₃₅⁺ spezifische T-Zellen in den auf der x-Achse angegebenen Verhältnissen eingesetzt. Die verwendeten Zielzellen sind in der Legende angegeben.

Bei Patient UTR wurde ebenfalls die zytotoxische Aktivität der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten gemessen. Wie bei Patient NRO wurden auch hier die TIL nach Isolierung aus dem Tumorgewebe 5 Tage unter Zusatz von IL-2 kultiviert, um eine ausreichende Zellzahl zu erreichen. Danach wurden diese Zellen als Effektorzellen im $^{51}\text{Chrom}$ freisetzungsversuch eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 25 dargestellt.

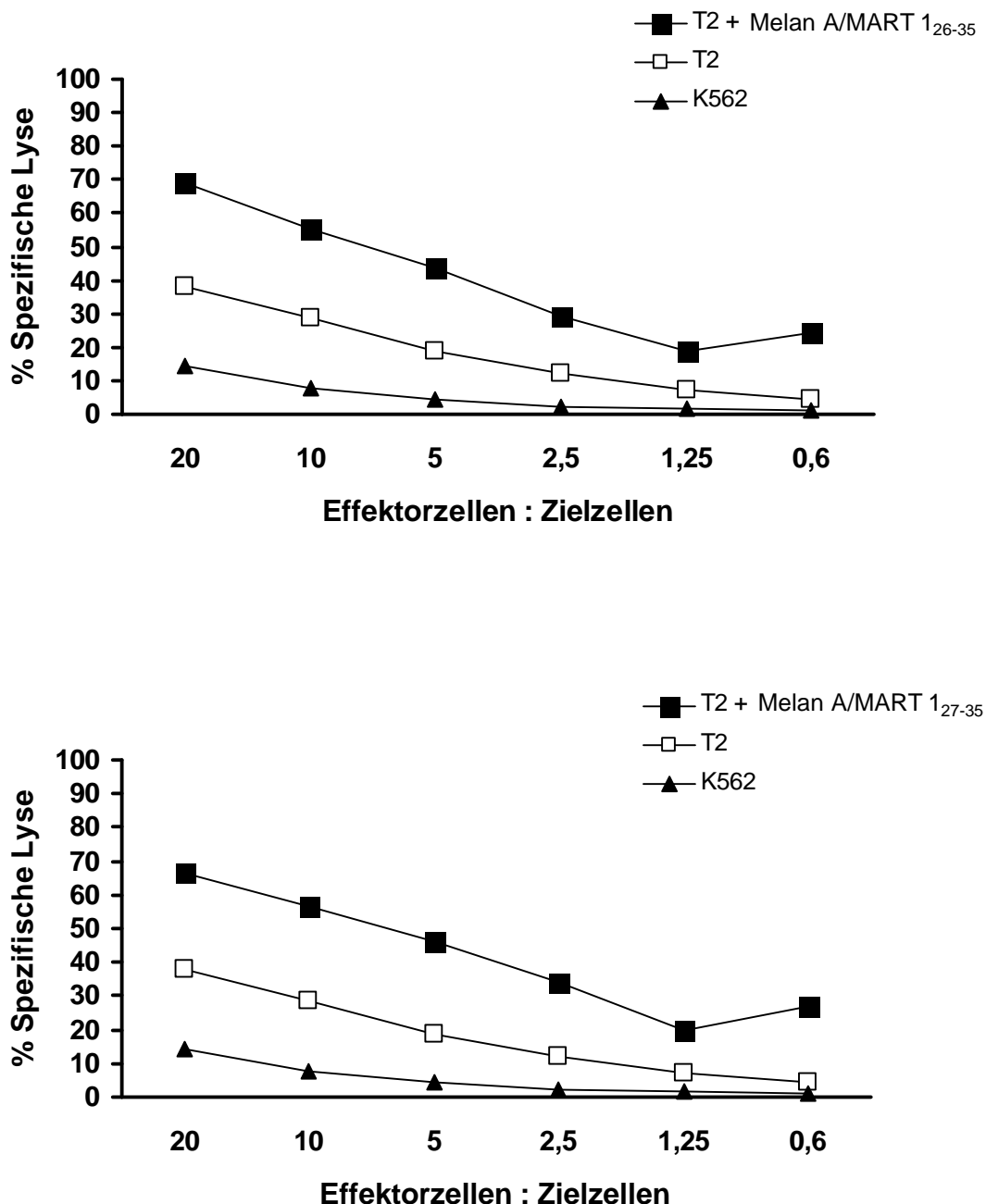


Abbildung 25: Bestimmung der spezifischen Lyse mittels $^{51}\text{Chrom}$ freisetzungsversuch bei Patient UTR. Als Effektorzellen wurden TILs aus Tumorgewebe in den auf der x-Achse angegebenen Verhältnissen eingesetzt. Die verwendeten Zielzellen sind in der Legende angegeben.

Die Tumor-infiltrierenden Zellen zeigten gegenüber beiden Peptiden eine Reaktivität. Allerdings waren die Werte für die spezifische Lyse bei den TILs niedriger als bei den isolierten Peptid-spezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut. Die TILs reagierten auf die Melan A/MART 1₂₆₋₃₅-gepulsten T2 Zellen mit einer spezifischen Lyse von 69%. Die zytotoxische Aktivität gegen Melan A/MART 1₂₇₋₃₅-gepulste T2 Zellen lag bei 66%. Die Lyse der ungepulsten T2 Zellen war mit 38% relativ hoch, was darauf hindeutet, dass in der TIL-Kultur auch T-Zellen mit nicht definierten Spezifitäten gegen T2-Zellen vorhanden waren. Die Lyse der K562-Zellen war mit 14% in einem Bereich, der für eine sehr geringe NK-Aktivität der TILs spricht.

Zusätzlich zu den mit MACS-Technik isolierten Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden bei diesen Patienten auch gemischte Lymphozytenkulturen, die mit Peptiden stimuliert wurden, angesetzt. Die hierdurch generierten Antigen-spezifischen T-Zellen zeigten in den ⁵¹Chromfreisetzungsversuchen ebenfalls eine hohe Reaktivität. Bei Patient UTR reagierten die Melan A/MART 1₂₇₋₃₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit einer spezifischen Lyse von 98% auf die mit diesem Peptid gepulsten T2 Zellen. Die entsprechenden Melan A/MART 1₂₆₋₃₅-spezifischen T-Zellen reagierten mit einer Lyse von 75% der korrespondierenden Zielzellen. Eine deutlich niedrigere spezifische Lyse wurde bei den generierten Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈-spezifischen T-Zellen gefunden. Hier wurde ein Wert von 30% gemessen, während bei den generierten gp100₁₅₄₋₁₆₂-spezifischen T-Zellen keine zytotoxische Aktivität festgestellt wurde. Bei Patient NRO zeigten die mit Melan A/MART 1₂₆₋₃₅-generierten spezifischen T-Zellen eine im gleichen Maße hohe Lyse (62%) wie die über MACS-Technik isolierten Zellen. Bei diesem Patienten war die Frequenz der Melan A/MART 1₂₇₋₃₅-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut mit maximal 0,3% zu gering, um eine Isolierung mittels MACS-Technik vorzunehmen. Nach 5-tägiger Kultur mit dem Peptid Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ in einer gemischten Lymphozytenkultur induzierten die Lymphozyten dieses Patienten eine spezifische Lyse von 66% der mit diesem Peptid gepulsten Zielzellen.

Die ⁵¹Chromfreisetzungsversuche zeigen, dass die Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen dieser Patienten *in vitro*, nach kurzzeitiger Kultivierung mit IL-2, eine zytotoxische Aktivität gegen entsprechende Zielzellen aufweisen.

4.2.9 Reaktion der CD8⁺ T-Zellen auf autologe Tumorzellen

Die Reaktion der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auf autologe Tumorzellen wurde mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung bestimmt. Dafür wurden die PBMCs des Patienten UTR mit den autologen Tumorzellen unter Zugabe von BFA für 5,5h inkubiert. Danach wurden die Zellen gegen die T-Zellmarker CD3 und CD8 und die Aktivierungsmarker CD69 und IFN γ gefärbt und im 4-Farben-FACS analysiert. Zusätzlich wurden Ansätze mit unstimulierten PBMCs, mit allogenen Tumorzellen stimulierten PBMCs und mit Peptid-stimulierten PBMCs mitgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 26 dargestellt.

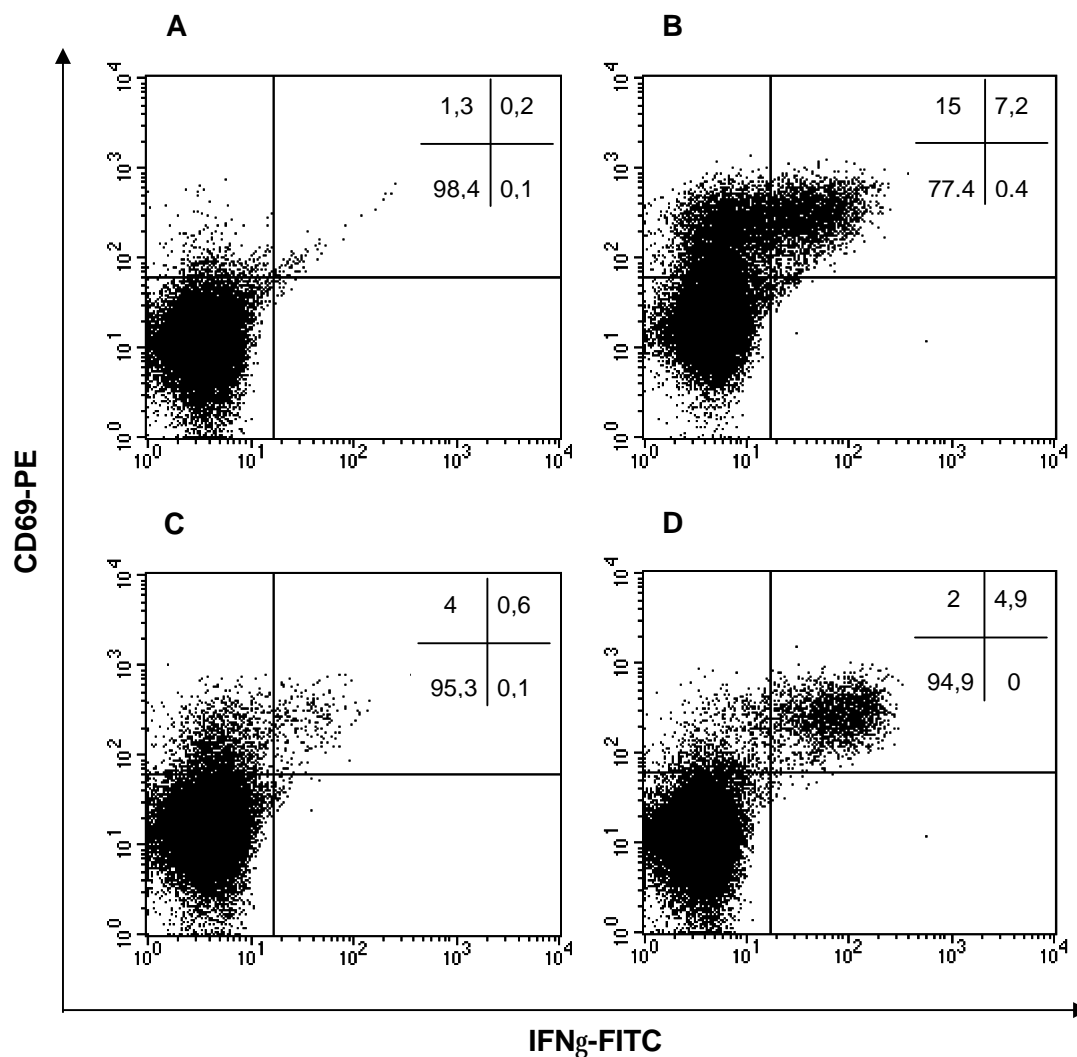


Abbildung 26: Reaktion der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen von Patient UTR auf autologe Tumorzellen (B), allogene Tumorzellen (C) und dem Peptid Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ (D); unstimulierte Kontrolle (A). Die Reaktivität wurde mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung, nach 5,5h Inkubation mit den angegebenen Stimuli, unter Zusatz von BFA gemessen. Dargestellt sind die CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen bezüglich ihrer CD69-Expression und IFN γ -Produktion.

Bei Patient UTR reagierten 7% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut auf die Stimulation mit autologen Tumorzellen mit IFN γ -Produktion und CD69-Expression. Auf die

allogenen Tumorzellen von einem ebenfalls HLA-A*0102 Patienten reagierten nur 0,4% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen mit der Expression dieser Marker. Die eingesetzte allogene Tumorzelllinie war im Gegensatz zu den autologen Tumorzellen eine Langzeitkultur. Durch die häufigen Teilungen könnten die Zellen Antigene von ihrer Oberfläche verloren haben. Der Verlust wichtiger Antigene könnte der Grund für die geringe Reaktion der Lymphozyten auf diese Tumorzellen sein. Hingegen wurden die Tumorzellen des Patienten UTR nur 5 Tage in Kultur gehalten und während dieser Zeit im Gegensatz zur allogenen Tumorzelllinie nur 1 x mit Trypsin behandelt. In den Ansätzen mit autologen Tumorzellen exprimierten 13,7% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen den Marker CD69, ohne jedoch IFN γ zu produzieren. Bei der Stimulation mit allogenen Tumorzellen waren dies 2,7%. Im Gegensatz dazu zeigten bei der Peptidstimulation nur 0,7% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen eine Expression des CD69 Markers ohne IFN γ zu produzieren. Diese Reaktionen sind vermutlich auf die vielfältigen antigenen Eigenschaften der Tumorzellen im Vergleich zu einem gereinigten einzelnen Antigen zurückzuführen. Auf das Peptid Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ reagierten insgesamt 4,7% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen mit IFN γ -Produktion und CD69-Expression.

Bei Patient NRO war, bedingt durch eine geringere Tumormasse, die Durchführung dieser Experimente nicht möglich. Die gesamten Tumorzellen wurden für therapeutischen Zweck (Hybridzell-Vakzination) benötigt.

4.3 Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen bei unbehandelten Melanompatienten

Das Vorhandensein von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde im peripheren Blut und in den Tumoren von unbehandelten Melanompatienten untersucht. Von Interesse war ein Vergleich der Frequenzen dieser Zellen im Tumor versus Blut, da anzunehmen ist, dass Antigen-spezifische T-Zellen eher im Tumor vorhanden sind.

Bei 5 HLA-A*0201⁺ und einem HLA-A*01⁺ Melanompatienten konnten Tumor-infiltrierende Zellen aus frischem Tumormaterial isoliert werden. Nach 5-8 Tagen Kultur unter Zusatz von IL-2 wurde die Reaktion auf die bekannten Melanompeptide mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung im Durchflusszytometer untersucht. Bei einem Patienten konnten auch ohne vorherige Kultur eine ausreichende Anzahl an TILs isoliert werden, die unmittelbar für die Frequenzbestimmung eingesetzt wurden. Die Frequenzen der Peptid-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut wurden mit isolierten PBMCs mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung bestimmt. Die Melanom-Metastasen wurden histologisch auf das Vorhandensein von Melanom-Antigenen untersucht.

4.3.1 Patienten

Keiner der Patienten erhielt eine chemotherapeutische Behandlung als die Metastasen zur TIL-Präparation exzidiert wurden. Bei Patient HGI war ein Primärtumor am linken Oberschenkel vorhanden. Es erfolgte die Exzision von 2 Metastasen thorakal und am Oberbauch links. Patient WBR entwickelte ein amelanotisches malignes Melanom. Nach Melanommetastasenbildung erfolgte eine Lymphknoten-Dissektion in der linken Leiste. Bei Patient VPA wurde die Exzision eines metastatischen Melanoms am Schulterblatt vorgenommen, gefolgt von der Exzision einer axillären Lymphknotenmetastase. Bei Patient WRE erfolgte die Exzision einer cerebralen Metastase und einer pulmonalen Metastase. Patient IWI entwickelte eine Metastase am Unterschenkel und inguinale und axilläre Lymphknotenmetastasen, die exzidiert wurden. Bei Patient LHE wurden eine pulmonale und eine suprapankreatische Lymphknotenmetastase entnommen.

4.3.2 Histologische Untersuchung der Metastasen

Für die immunhistochemische Untersuchung der Tumorzellen wurden Antikörper gegen die Melanom-Antigene Tyrosinase, gp100, Melan A/MART 1, MAGE-1 und MAGE-3 verwendet. Die Charakterisierung des T-Zellinfiltrats in den Metastasen erfolgte im Hinblick auf die Expression von CD3, CD8 und CD4. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Bei den Patienten HGI und WBR waren 25% der Zellen positiv für die jeweiligen Tumorantigene. Das T-Zellinfiltrat, bestehend aus CD4 und CD8 T-Zellen, war am Rand der

Tumoreale lokalisiert. Bei Patient VPA exprimierten die Tumorzellen keines der untersuchten Tumorantigene. Die Population der infiltrierenden T-Zellen war ausschließlich CD4⁺. Die Tumorzellen von Patient IWI exprimierten zu 25% die jeweiligen Tumorantigene. Ein gleicher Anteil von CD8- und CD4-positiven T-Zellen (50%) infiltrierte das Tumorgewebe bei diesem Patienten. Patient WRE zeigte im Tumor ebenfalls zu 25% eine Expression der jeweiligen Tumorantigene. Das T-Zellinfiltrat setzte sich in dieser Tumorprobe zu 25% aus CD4⁺ und zu 75% aus CD8⁺ T-Zellen zusammen. Bei dem HLA-A*01⁺ Patienten LHE exprimierten die Tumorzellen zu 25% das MAGE-3 Antigen und zu 5% das MAGE-1 Antigen. Die Tumor-infiltrierenden T-Zellen im Tumormaterial waren zu 50% CD4⁺ und zu 50% CD8⁺.

Tabelle 9: Histologische Untersuchung der Melanommetastasen bei unbehandelten Patienten. Es wurden spezifische Antikörper zur Anfärbung des T-Zellinfiltrats und der Melanom-Antigene eingesetzt. Quantifizierung: ++, 25-50% der Zellen positiv; +, 5-25% der Zellen positiv; (+), 2-5% der Zellen positiv; -, 0-2% der Zellen positiv. Lokalisation: R, am Rand der Metastase; F, Fokal.

HLA-A*0201 Patienten	CD3	CD8	CD4	Tyrosinase	gp100	Melan A/ MART 1	MAGE 3
HGI	R+	R+	R+	+	+	+	+
WBR	R+	R+	R+	+	+	+	F+
VPA	+	-	+	-	-	-	-
IWI	++	++	++	+	+	+	+
WRE	++	++	+	+	+	+	+

HLA-A*01 Patient	CD3	CD8	CD4	MAGE-1	MAGE-3
LHE	++	++	++	(+)	+

4.3.3 Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut

Bei unbehandelten Patienten wurden im peripheren Blut nur geringe Frequenzen von Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen detektiert. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut von unbehandelten HLA-A*0201⁺ und HLA-A*01⁺ Melanompatienten. Dargestellt sind die Prozente der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, die nach 5,5h Peptidstimulation unter Zusatz von BFA mit einer IFN γ -Produktion reagierten. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die gesamte CD8⁺-T-Zellpopulation.

HLA-A*0201 Patienten	MAGE-3 271-278	Melan A/ MART 1 27-35	Melan A/ MART 1 26-35	Tyrosinase 366-378	Gp100 54-162	gp100 280-288	gp100 476-485	gp100 457-466	gp100 209-217
HGI	0,03	0	0	0	0	0,03	0,01	0	0
WBR	0	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,04	0,01	0,02
VPA	0	0,01	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0	0,01
IWI	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02
WRE	0,02	0,01	0,04	0	0	0,07	0,01	0,01	0,03

HLA-A*01 Patient	MAGE-1 ₁₆₁₋₁₆₉	MAGE-3 ₁₆₈₋₁₇₆
LHE	0,01	0

Die Frequenzen der Peptid-spezifischen T-Zellen in dem peripheren Blut der unbehandelten Melanompatienten lagen in einer Größenordnung von 0-0,07%, in den unstimulierten Proben zwischen 0-0,02%. Auf das Kontrollpeptid CMV war die Reaktion bei allen Patienten nicht höher als 0,03%. Die HLA-A*0201⁺-Patienten zeigten auf das HLA-A*01-restringierte Peptid MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ (Kontrollpeptid) mit höchstens 0,03% ebenfalls eine Frequenz im Bereich des Färbungshintergrundes der unstimulierten Proben. Bei dem HLA-A*01⁺-Patienten wurde als Kontrollpeptid zusätzlich zu dem CMV-Peptid auch das HLA-A*0201-restringierte MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ Peptid eingesetzt. Auch hiermit wurde keine Stimulation der T-Zellen induziert. Patient HGI zeigte mit 0,06% die höchsten Frequenzen für die gp100-Peptide mit den

Sequenzen 154-162 und 209-217. Eine Reaktion von 0,04% zeigten die CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen dieses Patienten für das Peptid MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈. Für die restlichen Peptide waren die Frequenzen bei diesem Patienten mit 0-0,02% an der Nachweisgrenze. Bei Patient WBR zeigten 0,04% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen eine Reaktion auf das gp100₄₇₆₋₄₈₅ Peptid. Für die restlichen Peptide war die Reaktion mit 0-0,02% an der Nachweisgrenze. Die T-Zellen von Patient VPA reagierten auf keines der eingesetzten Melanompeptide. Bei Patient IWI wurde im peripheren Blut ebenfalls keine Reaktion der T-Zellen auf die eingesetzten Peptide festgestellt. Bei Patient WRE war die Frequenz der Peptid-spezifischen T-Zellen am höchsten; 0,07% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen reagierten auf das Peptid gp100₂₈₀₋₂₈₈, während 0,03% auf das gp100₂₀₉₋₂₁₇ Peptid reagierten. Eine Reaktion von 0,04% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen wurde in dem Ansatz mit dem Peptid Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ gemessen. Bei dem HLA-A*01-positiven Patienten LHE wurden keine spezifischen T-Zellen im peripheren Blut detektiert.

4.3.4 Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Tumor

Im Vergleich zum peripheren Blut war die Frequenz der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bei 3 der 6 Patienten im Tumorgewebe um ein Vielfaches höher. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe von unbehandelten HLA-A*0201⁺ und HLA-A*01⁺ Melanompatienten. Dargestellt sind die Prozente der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, die nach 5,5h Peptidstimulation unter Zusatz von BFA mit einer IFN γ -Produktion reagierten. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die gesamte CD8⁺-T-Zellpopulation.

HLA-A*0201 Patienten	MAGE-3 271-278	Melan A/ MART 1 27-35	Melan A/ MART 1 26-35	Tyrosinase 366-378	gp100 154-162	gp100 280-288	gp100 476-485	gp100 457-466	gp100 209-217
HGI	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
WBR	0,25	0,5	0,52	0,12	0,18	0,16	0,07	0,17	0,12
VPA	0	0	0,01	0	0,03	0	0	0,01	0
IWI	0,02	0,27	0,51	0	0,23	0,27	0	0	0,08
WRE	0	2,77	3	0,2	1,5	0,52	0,02	0,1	0,35

HLA-A*01		
Patient	MAGE-1 ₁₆₁₋₁₆₉	MAGE-3 ₁₆₈₋₁₇₆
LHE	0,04	0

Die Frequenzen der Peptid-spezifischen T-Zellen im Tumorgewebe der unbehandelten Melanompatienten lagen in einer Größenordnung von 0-2,77%, in den unstimulierten Proben zwischen 0-0,2%. Es zeigte sich, dass bei den Patienten die höhere Frequenzen an Peptid-spezifischen T-Zellen im Tumor aufwiesen, auch in den unstimulierten Proben eine höhere Anzahl an IFN γ -produzierenden Zellen vorhanden war. Diese Werte wurden jeweils von den Werten der stimulierten Proben subtrahiert. Auf das Kontrollpeptid CMV war die Reaktion der TILs bei allen Patienten nicht höher als 0,2%. Die HLA-A*0201⁺- Patienten zeigten auf das HLA-A*01-restringierte Peptid MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ (Kontrollpeptid) mit höchstens 0,2% auch keine spezifische Reaktion (der Wert ist mit dem Färbungshintergrund der unstimulierten Proben identisch). Bei dem HLA-A*01⁺-Patienten wurde als Kontrollpeptid zusätzlich zu CMV auch das HLA-A*0201-restringierte MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ Peptid eingesetzt. Auch hiermit wurde keine spezifische Stimulation der T-Zellen erzielt. Bei Patient HGI zeigten die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten keine Reaktion auf die eingesetzten Melanompeptide. Hingegen wurde bei Patient WBR auf jedes Peptid eine spezifische Reaktion der CD8⁺ T-Zellen festgestellt. Da bei diesem Patienten eine ausreichende Anzahl an TIL isoliert werden konnte, wurde die Frequenzbestimmung ohne vorherige Kultur mit IL-2 durchgeführt. Dadurch wurde eine kulturbedingte Verzerrung der Ergebnisse verhindert. Die mit 0,52% höchste Frequenz wurde bei diesem Patienten für das Peptid Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ gemessen. Bei Patient VPA lagen die Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit 0-0,03% an der Nachweisgrenze. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Tumorgewebe des Patienten IWI eine hohe Frequenz an Peptid-spezifischen T-Zellen. Für das Peptid Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ wurde eine Frequenz von 0,51% gemessen. Für die Peptide Melan A/MART 1₂₇₋₃₅ und gp100₂₈₀₋₂₈₈ wurde jeweils eine Frequenz von 0,27% festgestellt. Auf die restlichen Peptide reagierten 0-0,23% der CD8⁺ T-Zellen. Auch bei Patient WRE wurden im Tumorgewebe hohe Frequenzen an Peptid-spezifischen T-Zellen gemessen. Die höchste Frequenz (3%) zeigten bei diesem Patienten ebenfalls die Melan A/MART 1₂₆₋₃₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Im gleichen Bereich (2,77%) lag die Frequenz der Melan A/MART 1₂₇₋₃₅-spezifischen T-Zellen im Tumor dieses Patienten. Die Punktdiagramme der FACS-Analyse für die Messungen im peripheren Blut und Tumorgewebe wurden für diesen Patienten in Abbildung 27 und Abbildung 28 exemplarisch dargestellt. Bei dem HLA-A*01 positiven Patienten konnte nur für das Peptid MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉ eine geringe Anzahl (0,04%) von spezifischen T-Zellen detektiert werden.

Bei Patient WRE konnte eine detaillierte Untersuchung der TILs durchgeführt werden. Mittels FACS-Analyse wurden die Peptid-spezifischen T-Zellen auf die Expression der T-Zellmarker CD45RO, CD45RA, CD28, CD3zeta und CD56 untersucht. In den Messungen zeigten die Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zum Teil einen CD45RO⁺ zum Teil einen CD45RA⁺ Phänotyp. Für den Marker CD28 waren 75% dieser Zellen positiv. Alle spezifischen T-Zellen exprimierten CD3zeta und waren negativ für den NK-Zellmarker CD56. Da dieser Phänotyp sich deutlich unterscheidet von dem Phänotyp der im Blut vorkommenden Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ist ein Einfluss der Kulturbedingungen (IL-2) nicht auszuschließen. Ähnliche Ergebnisse bezüglich des Phänotyps von Antigen-spezifischen T-Zellen, die unter gleichen Kulturbedingungen gehalten wurden, wurden auch von anderen Arbeitsgruppen vorgestellt (Nielsen *et al.*, 2000; Valmori *et al.*, 2002).

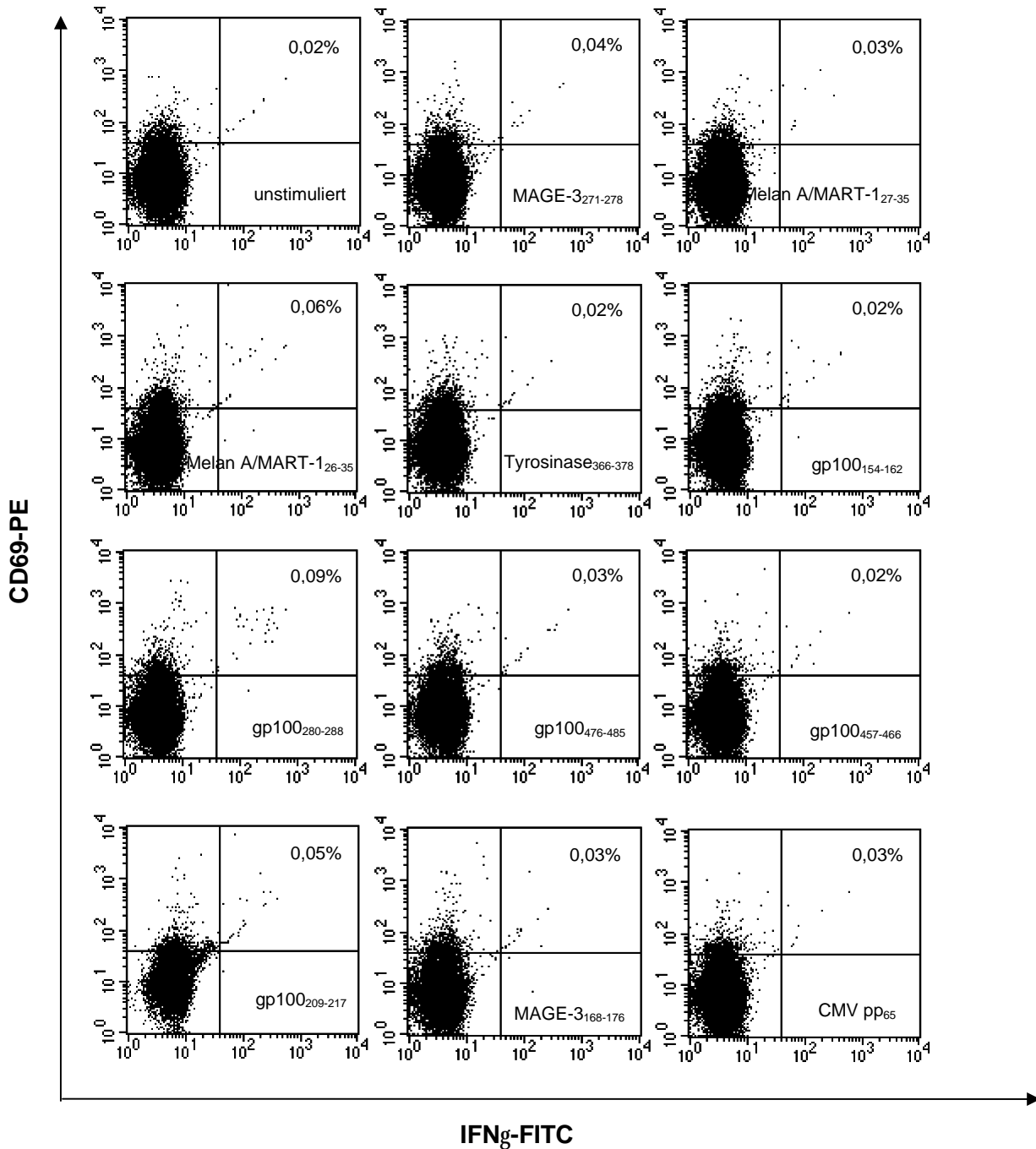


Abbildung 27: Frequenzen der Peptid-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut von Pat. WRE zum Zeitpunkt der Tumorentnahme. Die Frequenzen wurden mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung, nach 5,5-stündiger Peptid-Stimulation und unter Zugabe von BFA ermittelt. Als Kontrollpeptide wurden das HLA-A*01-restringierte MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ Peptid und das HLA-A*0201-restringierte CMVpp 65 Peptid eingesetzt. Dargestellt sind die CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen.

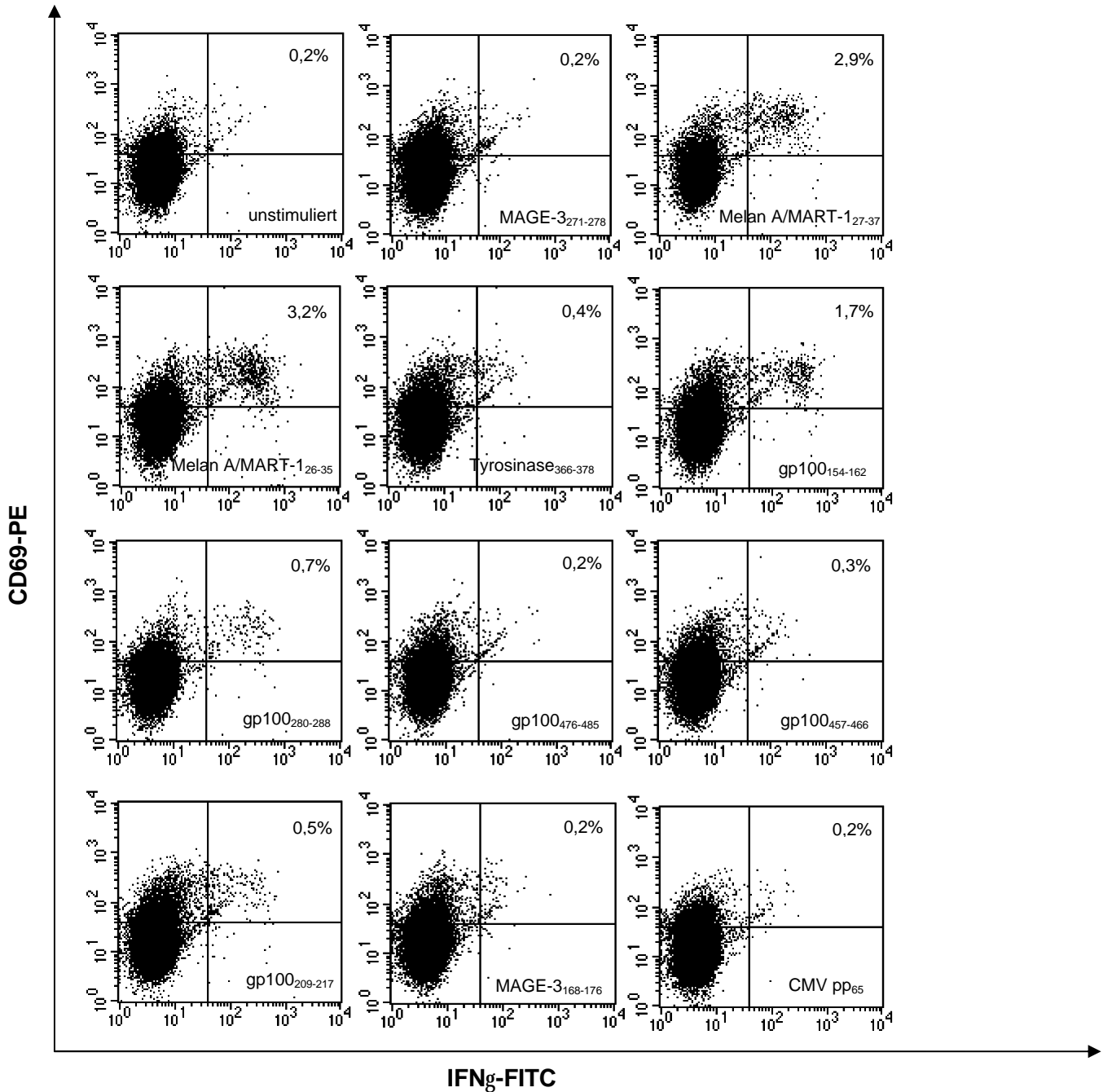


Abbildung 28: Frequenzen der Peptid-spezifischen T-Zellen im Tumorgewebe von Pat. WRE. Die Frequenzen wurden mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung, nach 5,5-stündiger Peptid-Stimulation und unter Zugabe von BFA ermittelt. Als Kontrollpeptide wurden das HLA-A*01-restringierte MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ Peptid und das HLA-A*0201-restringierte CMVpp 65 Peptid eingesetzt. Dargestellt sind die CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen.

5. Diskussion

5.1 Immuntherapien beim malignen Melanom

Das maligne Melanom gehört zu den Tumoren, gegen die zahlreiche Immunreaktionen *in vitro* und *in vivo* beschrieben sind. Nicht zuletzt deshalb werden beim Melanom, wie bei keinem anderen Tumor weltweit, die meisten immuntherapeutischen Ansätze entwickelt und angewendet. Dennoch konnten bis jetzt, trotz intensiver Bemühungen, durch Immuntherapien keine signifikanten Erfolge in der Behandlung von Melanompatienten mit disseminierter Erkrankung erzielt werden.

Die Fähigkeit oder Unfähigkeit des Immunsystems auf Tumoren zu reagieren ist bisher noch nicht aufgeklärt. Da Tumorzellen aus körpereigenen, normalen Zellen abstammen ist die Erklärung plausibel, dass sie vom Immunsystem ignoriert werden. Nur in einzelnen Fällen konnte gezeigt werden, dass Tumorpatienten Immunreaktionen gegen den Tumor entwickeln. Tumor-infiltrierende Lymphozyten, die aus Tumoren isoliert und expandiert wurden, zeigen *in vitro* eine zytotoxische Aktivität gegen frisch isolierte Tumorzellen (Topalian *et al.*, 1989; Spagnoli *et al.*, 1995; Panelli *et al.*, 1999). Diese Daten deuten darauf hin, dass im Tumor eine lokale Immunreaktion stattfinden kann und dass diese Reaktion Tumor-spezifisch ist. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass Tumor-infiltrierende T-Zellen spezifisch für Tumor-assoziierte Antigene sind (Romero *et al.*, 1998; Jäger *et al.*, 2002). Jedoch ist die biologische Relevanz von Tumor-spezifischen T-Zellen in Tumorpatienten nicht aufgeklärt, zumal sie häufig bei Patienten mit einem progredienten Krankheitsverlauf gefunden werden. Mehrere Gründe könnten für dieses scheinbare Paradoxon verantwortlich sein. Einerseits können putative, vom Tumor produzierte immunsuppressive Substanzen die Immunantwort verhindern und andererseits könnten die Anzahl und der funktionelle Status der Tumor-spezifischen T-Zellen für die Bekämpfung des Tumors unzureichend sein. Ziel einer Immuntherapie bei Tumorpatienten wäre demnach die optimale Aktivierung und die *in vivo* Expansion von Tumor-spezifischen T-Zellen.

Bei der Entwicklung von Strategien für anti-Tumor Vakzine werden zwei Richtungen verfolgt: a) die Anwendung von ganzen Tumorzellen oder deren RNA und b) der Einsatz von definierten Antigenen. Der Vorteil von Immuntherapien mit autologen Tumorzellen ist, dass hierin alle relevanten Tumorantigene enthalten sind. Eine Identifizierung der Tumorantigene, die für die Vakzination eingesetzt werden, ist somit nicht nötig. Im Tiermodell wurden bis jetzt mehrfach protektive Effekte von Tumorzell-Vakzinationen gezeigt, wobei definierte T-Zellantworten beobachtet wurden. In klinischen Studien erweist sich die Korrelation zwischen der Ansprechrate auf die Therapie und der Immunantwort als schwierig, da mehrere

Variablen vorhanden sind und die Untersuchung der Immunantwort komplex ist. Nur in einigen wenigen Fällen wird gezeigt, dass die Immunantwort gegen Tumor-spezifische Antigene mit der klinischen Antwort korreliert und somit ein Zusammenhang zwischen klinischen Effekten und Vakzination besteht (Nestle *et al.*, 1998; Jäger *et al.*, 1999; Kugler *et al.*, 2000; Scheibenbogen *et al.*, 2002).

Im Gegensatz dazu kann bei einer Vakzination mit definierten Antigenen, wie Tumor-Peptiden oder Tumor-assoziierten Peptiden die Immunantwort systematisch kontrolliert und besser in Verbindung mit klinischen Resultaten gebracht werden. Der Einsatz von Peptiden für eine Vakzination erfordert die Zugabe von stimulatorischen Adjuvantien. Vakzinationen, die mit Peptiden, ohne Zugabe von Adjuvantien oder mit wenig stimulierenden Adjuvantien durchgeführt wurden, können T-Zellen nicht effektiv aktivieren und somit Anergie erzeugen (Staveley-O' Carroll *et al.*, 1998; Grohmann *et al.*, 1998). Die Induktion von Anergie in Antigen-spezifischen T-Zellen wurde besonders in Bezug auf Autoimmunerkrankungen untersucht. Bei diesen Erkrankungen ist im Gegensatz zu Tumorerkrankungen eine Unterdrückung von reaktiven T-Zellen erforderlich (Yssel *et al.*, 1996; Adorni, 1993). Die Auswahl von Adjuvantien für eine Immuntherapie bei Tumorerkrankungen ist für den Erfolg der Therapie von großer Bedeutung.

Sowohl bei Peptid-Vakzinationen als auch bei Tumorzell-Vakzinationen ist eine genaue Untersuchung der spezifisch induzierten T-Zellantwort sehr wichtig für die Evaluation der Behandlung.

5.2 Peptid-Vakzination

Bei dieser klinischen Studie wurden vier Melanompatienten im Krankheitsstadium IV mit Melanom-assoziierten Peptiden in Kombination mit Helfer-Antigenen vakziniert. Ziel dieser Immuntherapie war die Induktion von Peptid-spezifischen cytotoxischen T-Lymphozyten. Die gleichzeitige Aktivierung von Helferantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, welche ihrerseits über die Produktion von IL-2 die Aktivierung und Proliferation der CTLs fördern, sollte die Effektivität der Vakzine dabei verstärken. Zum ersten Mal wurden für eine Tumor-Immuntherapie ubiquitär vorkommende Antigene, gegen die die Patienten eine Reaktion zeigten, eingesetzt. Als T-Helfer-Antigene dienten die *Recall*-Antigene (Alt-Tuberkulin, Candida-Antigen, Streptokokken-Antigen, Diphtherie-Toxoid, Tetanus-Toxoid, Trychophyton und Proteus) aus dem Merieux-Test™. Das Reaktionsprofil der Patienten auf die *Recall*-Antigene wurde vor Beginn der Therapie in einem Stempeltest auf der Haut erstellt. Somit wurde sichergestellt, dass das Immunsystem dieser Patienten, spezifisch für diese Antigene, eine Immunreaktion induzieren kann. Dieses sollte einen Vorteil gegenüber Vakzinen mit

allgemein aktivierenden Agenzien bieten, die jedoch in einzelnen Fällen keine Helferfunktion auslösen können. Die *Recall*-Antigene, auf die die Patienten eine Reaktion zeigten, wurden zusammen mit den Melanom-Peptiden intrakutan injiziert. Das Tumormaterial dieser Patienten wurde zuvor immunhistologisch auf das Vorkommen von Tumor-Antigenen untersucht.

Die Evaluation der Therapie wurde sowohl über klinische Parameter als auch über die Untersuchung der spezifischen Immunreaktion der Patienten durchgeführt. Für letztere wurden die Frequenzen der Peptid-spezifischen CTLs und der Helferantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut der behandelten Patienten bestimmt. Der Nachweis erfolgte mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung nach Restimulation der PBMCs mit den entsprechenden Peptiden bzw. Antigenen und anschließender FACS-Analyse zur Ermittlung der Frequenzen spezifisch reagierender T-Zellen. Das Immunmonitoring wurde vor der Vakzination sowie 24h und 48h nach Vakzination durchgeführt. In manchen Fällen erfolgte eine Analyse der spezifischen CTLs auch 6-7 Tage nach Vakzination. Die mit diesen Analysen gewonnenen Daten sollten zeigen, ob im Verlauf der Therapie eine Expansion, oder Veränderung der Kinetik des Auftretens der Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut stattfindet.

Alle Patienten zeigten eine Hautreaktion auf mindestens ein *Recall*-Antigen. Ein siebenfacher Anstieg der reaktiven T-Zellen (von 0,07% auf 0,51%) im peripheren Blut wurde bei Patient HIG nach der subkutanen Injektion von Proteus-Antigen beobachtet (siehe Abbildung 6). Nach 48h sank die Frequenz der Proteus-spezifischen T-Zellen unter den Ausgangswert. Es ist also anzunehmen, dass eine Induktion dieser Zellen durch die Vakzination stattgefunden hat. Der Aufenthalt dieser Zellen im peripheren Blut scheint in diesem Fall nur kurzzeitig zu sein. Eine Migration der Antigen-spezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut in sekundäre lymphatische Organe ist anzunehmen. Denkbar wäre auch die Eliminierung dieser Zellen durch Mechanismen der Homeostase, da das Antigen nicht längere Zeit im peripheren Blut persistiert. Weiterhin wurde der Effekt der Antigen-Applikation auf die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 untersucht. Nach der *in vitro* Stimulation mit Proteus-Antigen zeigten annähernd 55% der CD4⁺ T-Zellen eine Expression des CD69-Markers als Reaktion auf das Antigen. Nur 0,51% dieser Zellen produzierten zusätzlich auch IFN γ . Ob es sich hier um unterschiedliche T-Zellsubpopulationen handelt oder eine Funktionsstörung dieser Zellen in der IFN γ -Produktion besteht, bedarf noch näherer Untersuchungen. Bei der *in vitro* Stimulation mit dem Tuberkulin-Antigen gab es bezüglich des CD69-Markers keine erhöhte Reaktion. Im Gegensatz zu den Proteus-spezifischen T-Zellen waren die Tuberkulin-spezifischen T-Zellen

auch 48h nach Vakzination im peripheren Blut detektierbar. Eine Korrelation mit der Frequenz der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut konnte nicht festgestellt werden.

Generell zeigte sich im Verlauf der Behandlung mit einer zunehmenden Anzahl an Vakzinationen eine Abnahme der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut.

Bei Patient HKR wurden vor der ersten Vakzination MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉- und MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆-spezifische CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut detektiert. Die höchste Frequenz an MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉- und MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆-spezifischen T-Zellen wurde nach der ersten Vakzination gemessen (Abbildung 8). Nach dem fünften Vakzinationszyklus konnten bei diesem Patienten im peripheren Blut keine Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Die Erkrankung blieb bis zum fünften Vakzinationszyklus stabil, danach folgte eine Progression. Anhand der immunhistologischen Untersuchungen der Tumorprobe, die vor der Vakzination entnommen wurde, zeigte sich im Tumor ein T-Zellinfiltrat mit Expression von CD3, jedoch nur in geringem Maße die Expression von CD8. Auch die geringe Expression von Tumormarkern in dieser Probe könnte zu einer eher unzureichenden Stimulation der T-Zellen geführt haben. Durch die Vakzination wurden möglicherweise T-Zellen in den verbliebenen Metastasen reaktiviert, die zumindest ein Weiterwachstum des Tumors verhindern konnten.

Bei Patient ARU wurde erst während des dritten Vakzinationszyklus eine signifikante Frequenz der MAGE-1₁₆₁₋₁₆₉-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut gemessen. Im vierten Vakzinationszyklus wurden hingegen keine Peptid-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut detektiert (Abbildung 8). Dieser Patient zeigte nach der dritten Vakzination eine Progression der Erkrankung. In der untersuchten Tumorprobe waren Tumorantigene nur sehr gering exprimiert und auch nur eine geringe Anzahl an infiltrierenden T-Zellen vorhanden. Sollte ein ähnliches Verhältnis in den noch vorhandenen Metastasen bestanden haben, so wäre die Ausgangssituation für die Induktion einer Immunantwort gegen den Tumor schlechter als bei Patient HKR. Dennoch konnte auch bei diesem Patienten ein stabiler Zustand der Erkrankung für drei Monate erreicht werden.

Im Tumormaterial von Patient HIG, das vor der Vakzination entnommen wurde, waren keine infiltrierenden T-Zellen vorhanden, jedoch eine hohe Expression der Tumorantigene gp100 und Melan A/MART 1 in den Tumorzellen. Bei diesem Patienten erhöhte sich im peripheren Blut die Frequenz der CD8⁺ T-Zellen spezifisch für die Peptide MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈, Melan A/MART-1₂₇₋₃₅, gp100₁₅₄₋₁₆₂ und gp100₂₈₀₋₂₈₈ 24h nach Vakzination. Im zweiten Vakzinationszyklus zeigte dieser Patient eine Reaktion auf alle eingesetzten Peptide. Mit dem dritten Vakzinationszyklus nahm die Frequenz dieser Zellen im peripheren Blut ab, und ab dem vierten Vakzinationszyklus konnten keine Peptid-spezifischen T-Zellen mehr nachgewiesen werden (Abbildung 9). Obwohl in der untersuchten Tumorprobe, MAGE-3 von

den Tumorzellen nicht exprimiert wurde, wurden nach Vakzination T-Zellen, spezifisch für dieses Antigen im peripheren Blut detektiert. Eine Erklärung dafür wäre die Expression dieses Antigens in verbliebenen Metastasen und die Mobilisierung der spezifischen T-Zellen durch die Vakzine.

Eine erhöhte Frequenz der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde bei Patient KBI 24h nach der ersten Vakzination im peripheren Blut gemessen. Dabei stieg die Frequenz der gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen T-Zellen von 0,08% auf 1,25% an. Im weiteren Verlauf jedoch, verminderte sich die Frequenz dieser Zellen im peripheren Blut bis unter die Nachweisgrenze. Da kein Tumormaterial zur Verfügung stand, konnte keine Korrelation mit der Situation im Tumor gemacht werden. Bei diesem Patienten verschlechterte sich der Zustand nach der zweiten Vakzination.

Allgemein ist eine Progression der Krankheit mit zunehmender Anzahl an Vakzinationen festgestellt worden. Ob die Abnahme der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut nach mehreren Vakzinationen mit dem Verlauf der Erkrankung zusammenhängt, ist spekulativ. Eine Abnahme der Tumor-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut nach Peptid-Vakzination wurde jedoch vor kurzer Zeit bei Melan A/MART 1 vakzinieren Melanompatienten auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Jäger *et al.*, 2002; Lee KH *et al.*, 1998). Vielmehr ist die Kinetik der Induktion und Migration von Peptid-spezifischen T-Zellen in Betracht zu ziehen. Die Schwankungen der Frequenzen im peripheren Blut können von vielen Faktoren beeinflusst werden, die bislang noch nicht genauer untersucht wurden. Einen Einfluss auf die zelluläre Zusammensetzung des peripheren Blutes können unter anderen körperliche Belastungen, der Zeitpunkt der Blutentnahme oder auch die Dauer seit der letzten Mahlzeit haben. Solche Faktoren sind aber nur schwer zu standardisieren. Ein wichtiger Faktor ist der Zeitpunkt der Blutentnahme. Über die Migrations-Kinetik von induzierten Tumor-spezifischen CTLs ist im humanen System nicht viel bekannt. Aus ethischen Gründen konnten bei den Melanompatienten keine Untersuchungen im stündlichen Rhythmus durchgeführt werden. Es könnte sein, dass zu den Untersuchungszeitpunkten von jeweils 24h und 48h nach der Vakzination die Frequenz dieser Zellen im peripheren Blut schon verringert ist. Eine schnelle Migration der induzierten Tumor-spezifischen T-Zellen in Tumor-befallene Areale wäre denkbar. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht (Lee KH *et al.*, 1999). Hier konnte mit Tetramerfärbungen gezeigt werden, dass bei Melanompatienten nach Peptid-Vakzination die Frequenz der Peptid-spezifischen CTLs im peripheren Blut steigt. Bei Patienten, die zusätzlich mit IL-2 behandelt wurden und die eine Tumorregression zeigten, wurden im peripheren Blut hingegen keine spezifischen CTLs detektiert. Die Autoren vermuten hier, dass ein schnelles Einwandern dieser Zellen in den Tumor stattgefunden hat.

Eine signifikante Tumorregression wurde auch bei Patienten, die mit einem MAGE-3-Peptid behandelt wurden, beobachtet (Marchand *et al.*, 1999). Jedoch konnten auch hier keine Peptid-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut identifiziert werden. LEE und Kollegen fanden bei Melanompatienten, die mit einem gp100-Peptid in IFA vakziniert wurden, nach Untersuchungen mit spezifischen tetrameren MHC-Molekülen, im peripheren Blut erhöhte Frequenzen (0,2%-2,4% der gesamten CD8⁺ T-Zellpopulation) an Peptid-spezifischen T-Zellen. Auch hier bestand keine Korrelation zwischen den Frequenzen der Antigen-spezifischen T-Zellen und dem Verlauf der Tumorerkrankung (Lee KH *et al.*, 1999).

Eine Erklärung für die geringe Immunreaktion nach der Peptid-Vakzination und dem eher progressiven Verlauf der Erkrankung bei Patient ARU und KBI ist möglicherweise auf Tumorseite zu finden. Verschiedene Studien unterstützen die Hypothese, dass Tumoren durch die Induktion einer generellen Immunsuppression von dem Immunsystem nicht mehr erkannt werden (Reichert *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2001). Dieser Zustand wurde deutlich in Tiermodellen und bei Patienten mit einer hohen Tumormasse gezeigt und zeichnet sich durch eine geringere Antwort auf ubiquitäre *recall*-Antigene *in vivo* und eine verringerte T-Zellfunktion *in vitro*, die mit Veränderungen im T-Zell-Signaltransduktionweg korrelieren, aus (Tartour *et al.*, 1995; Renner *et al.*, 1996). Die Faktoren, die diese Veränderungen hervorrufen sind bis jetzt noch nicht eindeutig identifiziert worden. Die Veränderungen sind jedoch in einer hohen Prozentzahl der T-Zellen auffindbar, mit einem breiten Spektrum in der Antigenspezifität. Diese Form der Immunsuppression könnte einen signifikanten Einfluss auf die Effektivität einer Vakzination haben. Bisher wurde in den meisten Vakzinationsprotokollen die Effektivität der Helferantigene nicht systematisch kontrolliert. Bei einer generellen Immunsuppression ist es vorstellbar, dass die Reaktion auf oft verwendete Helferantigene wie KLH, CFA oder IFA auch vermindert ist. Bei dem vorgestellten Vakzinationsansatz in dieser Arbeit wird mit dem Hautstempeltest erstens sichergestellt, dass das Immunsystem der Patienten auf mindestens eines der eingesetzten *Recall*-Antigene noch reagieren kann. Durch den Einsatz dieses Antigens/e bei der Vakzination wird die Induktion von Antigen-spezifischen Th-Zellen gewährleistet und somit Hilfe für die CD8⁺ Peptid-spezifischen T-Zellen geboten. Sowohl in der Injektionsstelle als auch im peripheren Blut konnten Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Weshalb in diesem Vakzinationsansatz dennoch im peripheren Blut keine hohen Frequenzen an Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen gefunden wurden kann unterschiedliche Gründe haben. Auch bei Vakzinationsstudien anderer Arbeitsgruppen konnte keine Korrelation zwischen der Anzahl an Antigen-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut und dem Krankheitsverlauf gefunden werden. Anichini und Kollegen konnten in 4 von 9 Patienten, die mit einem Melan A/MART-1 Peptid vakziniert wurden, mittels LDA hohe Frequenzen an Melan A/MART-1-spezifischen T-

Zellen im peripheren Blut nachweisen, jedoch keine Tumorregression (Anichini *et al.*, 1999). Bei einer ähnlichen Studie, bei der Melanompatienten mit einem Tyrosinase-Peptid immunisiert wurden, zeigten die Frequenzanalysen mit der ELISPOT-Methode, dass bis zu 1 von 2000 CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut spezifisch für dieses Peptid waren. Dennoch wurde auch hier keine Regression sondern vereinzelt nur eine Stabilisierung der Tumorerkrankung festgestellt (Lewis *et al.*, 2000).

Eine mögliche Erklärung für das Vorhandensein von Tumor-spezifischen T-Zellen nach Vakzination und einer gleichzeitig hohen Tumormasse wäre, dass die eingeleitete Immunreaktion die quantitative Kapazität für eine Tumorregression nicht erreicht. In den meisten Studien handelt es sich, wie auch hier, um Patienten in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, die generell eine hohe Tumormasse aufweisen und bei denen das Immunsystem partielle Schäden aufweist. Erfolgsversprechender ist die Applikation von anti-Tumorthérapien im Anfangsstadium der Erkrankung wie zum Beispiel bei Patienten, bei denen der Primärtumor entfernt wurde und bei denen eine Vakzination als adjuvante Therapie gegen minimale Tumorrreste verabreicht wurde. So zeigt eine kürzlich veröffentlichte Studie, dass Melanompatienten, bei denen scheinbar die gesamte Tumormasse entfernt wurde, die Vakzination mit dem Melan A/MART 1₂₇₋₃₅-Peptid zu einer Induktion von Peptid-spezifischen T-Zellen führte und dass bei diesen Patienten eine verlängerte Tumor-freie Überlebenszeit festgestellt wurde (Wang *et al.*, 1999).

5.3 Hybridzell-Vakzination

Die Induktion einer Immunantwort durch die Anwendung von Hybridzellen, die aus DCs und Tumorzellen generiert wurden, ist in mehreren Fällen erfolgreich in der Bekämpfung von etablierten Tumoren im Tiermodell eingesetzt worden (Stuhler & Walden, 1994; Guo *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1997; Gong *et al.*, 1998). Die Fusionszellen exprimieren MHC-I, MHC-II und die ko-stimulatorischen Moleküle der DC und sowohl bekannte als auch unbekannte Antigene des Tumors. Somit werden polyklonale CTL-Antworten gegen multiple Tumorantigene generiert. Neuere Daten zeigten im humanen System nach Fusion allogener DCs mit autologen Tumorzellen eine effektive Therapie bei Nierenkarzinompatienten (Kugler *et al.*, 2000). Der Hintergrund für die Anwendung von allo-genen DCs als Fusionspartner ist, dass hohe Frequenzen von T-Zellen eines Individuums auf fremde MHC-Moleküle reagieren. Die Verwendung von DCs aus gesunden Spendern bietet einen Vorteil gegenüber autologen DCs von Tumorpatienten, da letztere in ihrer antigenpräsentierenden Funktion defekt sein könnten. Die allo-fusionierten Hybridzellen exprimieren sowohl die MHC Klasse II Moleküle der DC, die zur Stimulation von CD4⁺ T-Zellen dienen, als auch die Tumor

MHC Klasse I Moleküle der Tumorzellen, die eingene Tumorantigene an CD8⁺ T-Zellen präsentieren (Tanaka *et al.*, 2001). In diesem Mausmodell hat sich die Fusion allogener DCs mit Tumorzellen als vorteilhafter, im Vergleich zu autologen DCs, in der Induktion der Immunantwort erwiesen.

In unserem Therapieansatz wurden allogene, reife Dendritische Zellen mit autologen Tumorzellen fusioniert und als Hybridzellen für die Vakzination von Melanompatienten eingesetzt.

Mit der Hybridzell-Vakzine wurden 6 Melanompatienten im Krankheitsstadium III und IV behandelt. Durch diese Therapie konnte bei einem Patienten eine komplette Remission erzielt werden. Drei Patienten zeigten eine Stabilisierung der Krankheit über mehrere Monate und zwei Patienten waren progredient. Die Effizienz der Therapie wurde sowohl mit klinischen als auch mit immunologischen Parametern evaluiert. Das Immunmonitoring wurde vor, 24h und 48h nach Vakzination anhand der Frequenzbestimmung der reaktiven Antigen-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut durchgeführt. Die hohe Anzahl zirkulierender Peptid-spezifischer T-Zellen bei den Patienten UTR und NRO, ermöglichte eine genaue Charakterisierung dieser Zellen.

Patient MDU, der nach der Vakzination eine völlige Regression der vorhandenen kutanen Metastasen zeigte, hatte verglichen mit den Patienten UTR und NRO im peripheren Blut eine eher moderate Frequenz an Antigen-spezifischen T-Zellen. 24h nach der Vakzinierung wurden bei diesem Patienten MAGE-3- (0,14%), Melan A/MART 1₂₇₋₃₅- (0,11%) und Melan A/MART 1₂₆₋₃₅-spezifische T-Zellen (0,64%) im peripheren Blut detektiert. Auffällig war bei diesem Patienten, dass die CD8⁺ T-Zellen einen hohen Grundaktivierungsstatus zeigten. Auch ohne Peptid-Stimulation exprimierten 50% dieser Zellen CD69 und 20% sezernierten gleichzeitig IFN γ . Weiterhin fiel auf, dass bei diesem Patienten die Tumorzellen zu 50-80% die untersuchten Tumorantigene exprimierten, während bei den anderen Patienten diese Antigene im Tumor nur zu 20-40% exprimiert wurden. Sowohl die hohe Expression an Tumorantigenen als auch die konstitutive Expression der Aktivierungsmarker auf T-Zellseite sind optimale Vorraussetzungen für die Eliminierung des Tumors. Möglicherweise favorisierte diese Konstellation das gute Ansprechen von Patient MDU auf die Hybridzell-Vakzination.

Bei Patient FKÖ wurde nach zwei Vakzinationszyklen eine Progredienz der Erkrankung festgestellt und die Vakzinierung abgebrochen. Dieser Patient zeigte immunhistologisch im Tumor eine moderate Expression der Tumorantigene und infiltrierende CD8⁺ T-Zellen. Die Tumor-infiltrierenden T-Zellen zeigten jedoch im IFN γ -Test keine Reaktion auf die MAGE-1

und MAGE-3 Peptide. Auch im peripheren Blut wurden keine reagierenden Antigen-spezifischen T-Zellen detektiert, so dass der progrediente Krankheitsverlauf möglicherweise auf nicht-reagierende T-Zellen zurückzuführen ist.

Im Gegensatz dazu wurden bei Patient NRO, der nach der 3. Vakzination ebenfalls einen progredienten Krankheitsverlauf hatte, hohe Frequenzen an Antigen-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut gemessen. Schon vor der 1. Vakzination wurden bei diesem Patienten im peripheren Blut 1,16% CD8⁺, IFN γ -produziernde Melan A/MART 1₂₆₋₃₅-spezifische T-Zellen detektiert. Die Frequenz dieser Zellen stieg nach der 5. Vakzination auf 2,5% im peripheren Blut an. Die lytische Kapazität der aus dem peripheren Blut und Tumor isolierten Melan A/MART 1₂₆₋₃₅-spezifische T-Zellen wurde in einem ⁵¹Cr-Freisetzungsversuch getestet. Es zeigte sich, dass bei gleicher Effektor : Zielzellen-Konzentration die lytische Aktivität der Peptid-spezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut mit 70% höher war als die lytische Aktivität (50%) dieser Zellen aus dem Tumor. Vermutlich ist bei den TIL durch Einwirkung des Tumors eine Verminderung der lytischen Kapazität dieser Zellen induziert worden. Hingegen zeigten die Melan A/MART 1₂₇₋₃₅-spezifischen TIL aus dem Tumor mit 70% Lyse der Peptid-gepulsten T2-Zellen eine hohe lytische Aktivität. Jedoch konnte dieser Wert nicht mit entsprechenden Daten aus dem peripheren Blut verglichen werden, da die Frequenz dieser Zellen im peripheren Blut für die Durchführung dieser Analysen zu gering war. Trotz hoher Frequenzen an reaktiven Antigen-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut und im Tumor konnten diese T-Zellen auch nicht durch die Applikation der Hybridzell-Vakzine zu einer effizienteren Tumorantwort angeregt werden. Eine erhöhte Frequenz an Antigen-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut könnte auch ein Anzeichen für den Verlust der Fähigkeit dieser Zellen in der Tumor zu migrieren, sein. Drei Monate nach der 1. Vakzination kam es bei diesem Patienten zu weiteren Metastasierungen und Tumorwachstum. Auch wenn hohe Frequenzen an Antigen-spezifischen T-Zellen bei einigen Patienten vorzufinden sind, besteht die Möglichkeit, dass diese Zellen langsamer proliferieren als die Tumorzellen und eine effektive Lyse der Tumorzellen nicht mehr möglich ist.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass hohe Frequenzen an Antigen-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut nicht immer mit Regression des Tumors korrelieren. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht (Anichini *et al.*, 1999; Rosenberg *et al.*, 1999; Letsch *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu konnte eine Arbeitsgruppe bei einem mit autologen Tumorzellen vakzinierten Melanompatienten, mit einem sehr langsamen Krankheitsverlauf, über 10 Jahre einen Anstieg an Antigen-spezifischen CTLs im peripheren Blut nachweisen (Baurain *et al.*, 2000).

Patient IKL zeigte im Verlauf der Vakzinierung sowohl einen Rückgang als auch ein Neuauftreten von Metastasen. Die Metastase aus der die Hybridzell-Vakzine hergestellt wurde, zeigte immunhistologisch nur die Expression des gp100-Antigens. Nach 7-tägiger Kultur wurden die aus dieser Metastase isolierten TIL expandiert und auf ihre Spezifität mittels FACS-Analyse untersucht. Es zeigte sich, dass nur ein sehr geringer Anteil der TIL $CD8^+$ T-Zellen waren und eine niedrige Anzahl dieser Zellen auf Tumor-spezifische Peptide reagierte. Immunhistologisch wurden in der Tumorprobe im Infiltrat eine geringe Anzahl von $CD4^+$ T-Zellen gefunden. Interessanterweise wurden im peripheren Blut 24h nach Vakzination eine geringe Frequenz an Melan A/MART 1₂₇₋₃₅-spezifischen (0,12%) und an Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈-spezifischen (0,08%) T-Zellen identifiziert, obwohl diese Antigene in der untersuchten Metastase nicht exprimiert wurden. Eine Erklärung dafür könnte das Vorhandensein dieser Antigene in noch verbliebenen Metastasen oder das Resultat einer Selektion bestimmter Tumorantigene sein. Für Letzteres würde das Neuauftreten von Metastasen sprechen.

Bei Patient WCO zeichnete sich der Tumor durch eine geringe Expression an Tumorantigenen aus. Die immunhistologische Untersuchung der Tumorprobe zeigte eine mittlere Anzahl an infiltrierenden Zellen (30%), die $CD8$ -positiv waren. Im peripheren Blut dieses Patienten wurden auch nach Vakzination keine Antigen-spezifischen Zellen detektiert. Dennoch konnte durch die Hybridzell-Vakzine ein stabiler Zustand über neun Monate induziert werden. Da das Immunsystem durch diese Vakzine mit allen Antigenen des Tumors stimuliert wurde, ist es anzunehmen, dass T-Zellen, die für andere Tumorantigene als die zur Detektion eingesetzten Peptide spezifisch sind, aktiviert werden können und zur Bekämpfung des Tumors beitragen.

Eine hohe Frequenz für die bekannten Melanomantigene Melan A/MART 1₂₇₋₃₅ und Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ spezifischen T-Zellen wurden im peripheren Blut und Tumor des Patienten UTR detektiert. Das Immunmonitoring konnte bei diesem Patienten erst ab der 20. Vakzinierung durchgeführt werden. Über 3% bzw. 2% der zirkulierenden $CD3^+/CD8^+$ T-Zellen waren zu diesem Zeitpunkt spezifisch für das Peptid Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ bzw. Melan A/MART 1₂₇₋₃₅. Die Frequenz dieser spezifischen T-Zellen erhöhte sich im peripheren Blut nach jeder weiteren Vakzination (Abbildung 12). Verglichen mit den anderen Patienten wurde bei Patient UTR im peripheren Blut auch eine hohe Frequenz (2,75%) an Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈-spezifischen T-Zellen identifiziert. Bezüglich der Spezifität wurden im peripheren Blut verglichen mit dem Tumor gewisse Unterschiede im T-Zellrepertoire festgestellt. So konnte im 20. Vakzinationszyklus 24h nach Vakzination im peripheren Blut

eine geringe Anzahl an gp100₁₅₄₋₁₆₂-spezifischen T-Zellen (0,21%) identifiziert werden. Die Frequenzanalyse der im Tumor befindlichen TIL zeigte, dass im Tumor keine Zellen mit dieser Spezifität vorzufinden waren. Wiederum wurden im Tumor 1% MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ spezifische T-Zellen identifiziert, während im peripheren Blut diese Zellen auch nicht nach wiederholten Vakzinationen vorzufinden waren. In der Tumorprobe, aus der die 20. Hybridzell-Vakzine hergestellt wurde, exprimierten die Tumorzellen die Antigene Melan A/MART-1 und MAGE-3 nicht. Es ist anzunehmen, dass die im Tumor vorgefundenen, für diese Antigene spezifischen T-Zellen, verantwortlich für die Eliminierung dieser Tumorzellen waren, da diese Zellen eine hohe zytotoxische Aktivität aufwiesen. Die Peptid-spezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut zeigten eine geringfügig höhere lytische Aktivität (70-90% Lyse) als die Tumor-infiltrierenden T-Zellen (70% Lyse) gegenüber den Peptid-gepulsten Zielzellen. Die *in vitro* gezeigte, hohe zytotoxische Aktivität der Tumor-spezifischen T-Zellen könnte bei diesem Patienten den über Monate stabilen Krankheitszustand begünstigt haben.

5.4 Charakterisierung der Peptid-spezifischen T-Zellen

Die Tumor-spezifischen T-Zellen von Patient UTR und NRO wurden mit tetrameren Peptid-beladenen MHC-I-Molekülen bezüglich ihrer Spezifität charakterisiert und des weiteren auf die Expression von Linien-, Differenzierungs- und Aktivierungsmarkern untersucht. Die FACS-Analysen zeigten, dass bezüglich der Linienmarker alle Antigen-spezifischen T-Zellen CD3- und CD8-positiv waren. Es ist bekannt, dass bestimmte T-Zellpopulationen am Ende ihrer Differenzierung auch NK-Zellmarker exprimieren können. Die Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ und Melan A/MART 1₂₇₋₃₅-spezifischen T-Zellen waren negativ bezüglich der Marker CD16 und CD56 und exprimierten den Marker CD57. Die genaue Funktion von CD57 ist noch nicht bekannt. Eine Rolle im Zell-Zell-Kontakt und eine gewisse Suppressor-Funktion für die CTL Entwicklung werden diesem Marker zugeschrieben (Wang *et al.*, 1994). Die Expression dieses Markers auf den Tumor-spezifischen T-Zellen gibt einen Hinweis zur Differenzierung dieser Zellen. CD57 wurde auch auf Virus-spezifischen T-Zellen bei chronischen Viruserkrankungen identifiziert (Hamann *et al.*, 1999) und zeichnete hier zusammen mit anderen Markern einen enddifferenzierten T-Zelleffektortyp aus.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Expression von Differenzierungs- und Aktivierungsmarker auf diesen Zellen untersucht. Ein wichtiges Molekül für die T-Zellaktivierung ist CD28, welches an die co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 bindet und die Aktivierung von naiven und ruhenden „memory“ T-Zellen induziert (Schwartz, 1992). In der vorliegenden Arbeit zeigten die FACS-Analysen bezüglich dieses Markers, dass die Peptid-spezifischen IFN γ -produzierenden T-Zellen diesen Marker nicht

exprimierten. Der CD8⁺/CD28⁻ T-Zellphänotyp wurde in neueren Berichten vermehrt auch bei gesunden älteren Personen beschrieben (Mugnaini *et al.*, 1999; Nociari *et al.*, 1999). Die Analysen der V β T-Zellklonalität zeigten hier, dass CD8⁺/CD28⁻ T-Zellklone über Jahre im peripheren Blut überleben können. Die Autoren vermuten, dass es sich um Antigen-„erfahrene“ T-Zellen handelt und konnten zeigen, dass diese Zellen sich von CD8⁺/CD28⁺ T-Zellen ableiten. Des weiteren wurden innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation, bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses, mit rheumatoider Arthritis, bei Transplantationspatienten und Patienten mit HIV-Infektionen ein hoher Anteil an CD8⁺/CD28⁻ T-Zellen gefunden (Kaneko *et al.*, 1996; Fitzgerald *et al.*, 1995; Vingerhoets *et al.*, 1995). Neuere Untersuchungen beschreiben diesen Phänotyp auch bei Melanompatienten (Speiser *et al.*, 1999; Valmori *et al.*, 2002). Unsere Ergebnisse bestätigen, dass es sich hier um Antigen-spezifische T-Zellen handelt und lassen vermuten, dass ähnlich wie bei chronischen Erkrankungen, diese Zellen bei Tumorpatienten über einen langen Zeitraum bestehen können.

Das CD27 Molekül befindet sich auf T-Zellen und auf einer B-Zellsubpopulation und wird nach der Aktivierung dieser Zellen hochreguliert. Der Ligand für CD27, das CD70 Molekül, gehört zur TNF-Familie und wird transient nach Aktivierung auf T- und B-Zellen exprimiert (Oshima *et al.*, 1998). Da beide Moleküle von aktivierten T-Zellen exprimiert werden und CD70 nicht von Dendritischen Zellen exprimiert wird, wird vermutet, dass die CD27-CD70 Interaktion durch die T-Zell-T-Zell Interaktion, nach einer initialen Aktivierung durch CD28, zur Expansion der T-Zellen führt (Lens *et al.*, 1998; Watts *et al.*, 1999). Bezüglich dieses Markers zeigten die Peptid-spezifischen T-Zellen einen gemischten Phänotyp. Nur 32% der CD3⁺/CD8⁺ IFN γ -produzierenden T-Zellen exprimierten nach Stimulation mit dem Peptid Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ den Marker CD27. Die restlichen Peptid-spezifischen T-Zellen waren negativ für diesen Marker. Durch Studien bei viralen Infektionen konnte die T-Zellentwicklung bezüglich der Marker CD28 und CD27 untersucht werden (Kern *et al.*, 1996; Effros *et al.*, 1996). Obwohl noch nicht gänzlich aufgeklärt wird postuliert, dass bei viralen Erkrankungen CD8⁺/CD28⁺/CD27⁺ T-Zellen nach mehrfachen Teilungen erst das CD28 und danach CD27 verlieren und ein enddifferenziertes CD8⁺/CD28⁻/CD27⁻ Stadium erlangen (Hamann *et al.*, 1999).

Die Untersuchungen mit den tetrameren MHC I Molekülen, beladen mit den Peptiden Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ oder Melan A/MART 1₂₇₋₃₅ zeigten bei Patient UTR, dass ein geringer Prozentsatz (2,5%) der Tetramer-spezifischen T-Zellen, die nach Peptid-Stimulation kein IFN γ produzierten, CD28 exprimierten. Die Tetramer⁺/IFN γ -produzierende T-Zellpopulation exprimierte diesen Marker nicht. Ob es sich bei den Tetramer⁺/CD28⁺ T-Zellen um anerge T-

Zellen handelt, die nach Peptid-Stimulation kein IFN γ produzieren konnten, oder diese Zellen sich in einem bestimmten Differenzierungs-Aktivierungs/post-Aktivierungsstadium befinden, bleibt noch offen.

In einer Untersuchung in einem Xeno-Transplantationsmodell konnte gezeigt werden, dass allo-reaktive CD8 $^{+}$ /CD28 $^{-}$ T-Zellen die CD4 Th-Antwort unterdrücken (Liu *et al.*, 1998). Die CD8 $^{+}$ /CD28 $^{-}$ T-Zellen konnten in diesem Modell die Hochregulation von CD40L auf den CD4 $^{+}$ Th-Zellen unterdrücken und dadurch eine effiziente Stimulation dieser Zellen durch die MHC II Xenoantigene verhindern. Der suppressive Mechanismus der CD8 $^{+}$ /CD28 $^{-}$ T-Zellen scheint durch das Interferieren im CD40L-CD40 Signalweg zustande zu kommen. Durch die Interaktion dieser Zellen mit APCs (dabei werden suppressive Peptide auf der APC vorausgesetzt) werden vermutlich die co-stimulatorischen Moleküle auf der APC herunterreguliert und hierdurch die stimulatorische Funktion dieser Zellen reduziert. Anders als bei den klonal expandierten CD8 $^{+}$ /CD28 $^{-}$ T-Zellen bei Viruserkrankungen zeigten die alloreaktiven CD8 $^{+}$ /CD28 $^{-}$ T-Zellen keine zytotoxische Wirkung (Ciubotariu *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu demonstrieren die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit und neueste Publikationen (Valmori *et al.*, 2002), dass die Peptid-spezifischen CD8 $^{+}$ /CD28 $^{-}$ T-Zellen bei Melanompatienten eine hohe lytische Aktivität besitzen.

Um den Phänotyp der Melanom-spezifischen CD8 $^{+}$ /CD28 $^{-}$ T-Zellen genauer zu charakterisieren, wurden diese Zellen auf die Expression der Isoformen des CD45 Moleküls untersucht. CD45 ist eine Phosphatase, die von allen Leukozyten exprimiert wird und bei der Aktivierung dieser Zellen eine Rolle spielt. T-Zellen, die die CD45RO Isoform exprimieren werden als „memory“ T-Zellen bezeichnet. Sie können leichter aktiviert werden als die T-Zellen die die CD45RA Isoform exprimieren (Michie *et al.*, 1992). Die CD45RA $^{+}$ T-Zellen werden als naive T-Zellen bezeichnet und benötigen zur Aktivierung weitere co-stimulatorische Moleküle. Neure Untersuchungen zeigen, dass sogenannte „memory“ Effektor T-Zellen ebenfalls CD45RA exprimieren (post-„memory“ Phänotyp). Die Differenzierungswege der unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen wurden in erster Linie bei Viruserkrankungen erforscht (Hamann *et al.*, 1997). Nach Virusinfektionen wurde eine deutliche Expansion in der „memory“ CD8 $^{+}$ /CD45RA $^{-}$ /CD28 $^{+}$ /CD27 $^{+}$ T-Zellpopulation beobachtet. Diese Zellen zeichneten sich auch durch die hohe Expression an Ki67 aus, einem Marker der während der Zellteilung exprimiert wird. Im Laufe der viralen Infektion wurde auch eine CD28 $^{-}$ /CD27 $^{-}$ CD8 $^{+}$ -T-Zellpopulation identifiziert, die eine geringe Expression von Ki67 und einen hohen Perforingehalt aufweist. Ein Teil dieser Zellen exprimierte CD45RA und zeichnete sich durch eine geringe proliferative Kapazität aus. Die Tatsache, dass diese T-Zellen verkürzte Telomere aufweisen, verglichen mit der

CD8⁺/CD28⁺ Population und eine hohe lytische Aktivität zeigen, unterstützt die Hypothese, dass es sich hier um enddifferenzierte T-Zellen handelt (Hamann *et al.*, 1999).

Angelehnt an das virale Modell sind die Tetramer⁺/IFN γ -produzierenden T-Zellen in der vorliegenden Arbeit bezüglich der CD45 Isoformen auch einem Effektor „memory“ Typ zuzuordnen. Die Tetramer-spezifischen/IFN γ -produzierenden T-Zellen, die auf das Peptid Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ bzw. auf Melan A/MART 1₂₇₋₃₅ reagierten, waren zu 33% bzw. 38% CD45RA positiv. Diese Zellen exprimierten den CD28 und den CD27 Marker nicht und exprimierten nur zu einem geringen Prozentsatz (0,1%) den Proliferationsmarker Ki67. Die Antigen-spezifischen T-Zellen exprimierten jedoch Perforin und zeigten eine hohe cytotoxische Aktivität im ⁵¹Cr-Freisetzungsversuch. Demnach ist der CD8⁺/CD28⁻/CD27⁻ und teilweise CD45RA⁺ gefundene Phänotyp der Melanom-spezifischen T-Zellen ein enddifferenzierter Zelltyp mit Effektorfunktion. Im Gegensatz dazu zeigen Melan A/MART 1₂₆₋₃₅-spezifische T-Zellen im peripheren Blut gesunder Personen einen naiven Phänotyp mit Expression von CD28 und CD45RA und keine zytotoxischen Effekte (Pittet *et al.*, 1999).

Anhand der Expression des CCR7-Markers werden die T-Zellen bezüglich ihrer „homing“ Eigenschaften unterteilt (Sallusto *et al.*, 1999). CCR7⁺ T-Zellen haben die Eigenschaft in die Lymphknoten zu migrieren, während CCR7⁻ T-Zellen zu inflammatorischen Stellen migrieren können. Folgendes Differenzierungsmodell der Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde bei viralen Erkrankungen experimentell bestätigt: CD45RA⁺CCR7⁺ ? CD45RA⁻CCR7⁺ ? CD45RA⁻CCR7⁻ ? CD45RA⁺CCR7⁻ (Champagne *et al.*, 2001). Hierbei repräsentiert der CD45RA⁺CCR7⁻ Phänotyp ebenfalls ein Enddifferenzierungsstadium der T-Zelle mit hohem Perforingehalt. Vor kurzer Zeit wurden bei Melanompatienten Tyrosinase-spezifische T-Zellen identifiziert, die ebenfalls CD45RA⁺CCR7⁻ waren, CD28 nicht exprimierten, einen hohen Perforingehalt aufwiesen und hohe Tumor-spezifische Zytotoxizität zeigten (Valmori *et al.*, 2002). Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Antigen-spezifischen T-Zellen waren ebenfalls CD28 negativ, exprimierten zu 70% Perforin und waren zytotoxisch aktiv. Die Fähigkeit von Tumor-DC-Hybridzellen in der Induktion zytotoxischer T-Zellen wurde *in vitro* auch für andere Tumorentitäten gezeigt. So konnten Gong und Kollegen zeigen, dass sowohl Fusionszellen aus Brusttumorzellen und DCs als auch Ovarkarzinomzellen-DC Hybride eine stärkere Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen hervorriefen als Tumorzellen und DCs alleine (Gong *et al.*, 1999; Gong *et al.* 2000).

Die Frequenzen der Tumor-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut wurden mittels Färbung mit Peptid-beladenen tetrameren MHC-Molekülen und die funktionelle Kapazität dieser

Zellen über intrazelluläre IFN γ -Färbung nach spezifischer Stimulation bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass nicht alle Tumor-spezifischen T-Zellen aktivierbar waren. Die Färbung mit den Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ –beladenen tetrameren MHC-Molekülen ergab, dass 10% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen bei Patient UTR positiv für dieses Peptid waren. Jedoch konnten nur 50% dieser Zellen nach Peptid-Stimulation IFN γ produzieren. Anhand der Messungen mit den Melan A/MART 1₂₇₋₃₅ –beladenen tetrameren MHC-Molekülen wurde festgestellt, dass 11% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen spezifisch für dieses Peptid waren. Funktionell waren aber nur 20% dieser Zellen in der Lage, nach Peptid-Stimulation IFN γ zu produzieren. Somit wurde gezeigt, dass mehr als die Hälfte der Antigen-spezifischen T-Zellen auf die Peptid-Stimulation nicht reagieren konnten. Des weiteren exprimierten die IFN γ -produzierenden Zellen die Aktivierungsmarker CD69 und CD44, die eine Rolle in der Einleitung der Aktivierung bzw. bei Adhäsion und Migration von Zellen spielen.

Interessanterweise war sowohl bei Patient UTR als auch bei Patient NRO die Reaktion auf das Mimotop Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ um ein vielfaches stärker, verglichen mit der Reaktion auf das natürliche Epitop Melan A/MART 1₂₇₋₃₅. Hierbei könnte die Affinität und Avidität der Antigen-spezifischen T-Zellen eine Rolle spielen. Als weitere mögliche Hypothese für die Koexistenz von spezifischem Immunsystem und Tumor wird eine geringe Affinität der Tumor-spezifischen T-Zellen diskutiert. Viele der derzeit bekannten Tumor-assoziierten Antigene sind Differenzierungsantigene oder unveränderte Proteine, die im Tumorkontext überexprimiert werden. T-Zellen mit großer Affinität zu diesen Autoantigenen sollten in der Regel bei der Reifung der Zellen im Thymus durch negative Selektion eliminiert werden und nur solche mit geringer Affinität im Repertoire der peripheren T-Zellen vorhanden sein. Diese Zellen sollten jedoch nicht in der Lage sein, eine effiziente Antwort gegen die Tumorantigene zu vollziehen. Die künstliche Veränderung der Peptidsequenz eines Tumor/Autoantigens führt zur Änderung der Affinität der spezifisch reagierenden T-Zellen. Ebenfalls kann durch das Mimotop ein unterschiedliches Repertoire an T-Zellen angesprochen werden.

Whiteside und Kollegen argumentieren, dass die Tumor-spezifischen T-Zellen durch chronische Überstimulation oder spezifische Signale anergisiert sind und funktionelle Defekte aufweisen. In histologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Tumor-infiltrierenden Zellen die CD3 ζ -Kette des T-Zellrezeptor-Komplexes nur schwach oder gar nicht exprimieren (Dworacki *et al.*, 2001). Damit fehlt diesen Zellen ein wichtiger Bestandteil des Signaltransduktionsweges und sie zeigen auch bei vorhandener Antigenität des Tumors eine reduzierte bzw. keine Reaktionsfähigkeit gegenüber dem Antigen. Die Untersuchungen der Antigen-spezifischen T-Zellen bei Patient UTR zeigten, dass die Tetramer⁺/IFN γ ⁺ T-Zellen die CD3 ζ -Kette verglichen mit den übrigen T-Zellen, in einem

niedrigeren Maße exprimierten. Dieses könnte ein Grund sein für die *in vivo* verminderte Anti-Tumorreaktion dieser Zellen.

Die Expression von „Killer Inhibitory Receptors“ (KIR) auf CTL kann ebenfalls das Auslösen eines Aktivierungssignals auf diesen Zellen verhindern. Grundsätzlich haben diese Rezeptoren sowohl auf bestimmten T-Zellsubpopulationen, als auch auf NK-Zellen eine regulatorische Funktion (Raulet *et al.*, 2001). Die Antigen-spezifischen, IFN γ -produzierenden T-Zellen von Patient UTR und NRO exprimierten die inhibitorischen, IgG-ähnlichen Rezeptoren (CD158a, CD158b, NKAT2, NKB1) nicht oder nur in sehr geringem Maße. Im Gegensatz dazu wurde der Lektin-ähnliche Rezeptor CD94 bei beiden Patienten von den Peptid-spezifischen, IFN γ -produzierenden T-Zellen exprimiert. Dieser Rezeptor bildet Heterodimere mit Isoformen des NKG2-Moleküls und kann je nach Isoform eine inhibierende oder aktivierende Funktion ausüben. Die Untereinheiten NKG2A und –B enthalten eine ITIM –Region (engl.: *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), welche inhibitorische Signale vermittelt (Leibson, 1997). Im Gegensatz dazu vermitteln die Moleküle NKG2C und –E über das Adaptermolekül DAP12 T-Zell-aktivierende Signale (Lanier, 2001). Der für diese Färbungen verwendete Antikörper erkennt jedoch nur das CD94 Molekül und gibt somit keinen Aufschluss über die assoziierten inhibitorischen oder aktivierenden Untereinheiten. Die Expression des CD94-Moleküls scheint jedoch keine inhibitorische Funktion auf die Aktivierbarkeit der Antigen-spezifischen T-Zellen auszuüben, da diese Zellen durch Peptidstimulation IFN γ produzieren konnten und auch entsprechende Peptid-gepulste Zielzellen lysierten. Diese Zellen zeigten ebenfalls eine hohe Reaktivität gegenüber autologen Tumorzellen. 7% der CD8⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut reagierten mit Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und IFN γ -Produktion auf die eigenen Tumorzellen. Parallel reagierten auf die Stimulation mit dem Melan A/MART 1₂₆₋₃₅-Peptid nur 4,7% der CD8⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut. Demnach sind auf den Tumorzellen andere Antigene vorhanden, die Epitope für Tumor-spezifische T-Zellen aufweisen und diese Zellen auch spezifisch aktivieren können. Hiermit zeigt sich der Vorteil einer Vakzination mit dem gesamten Antigenrepertoire des Tumors verglichen mit einzelnen Tumor-Peptiden. Die Anzahl der T-Zellen, die durch die Stimulation mit Tumorzellen den Aktivierungsmarker CD69 exprimierten war, mit 21% der gesamten CD8⁺ T-Zellpopulation sehr hoch. Jedoch konnte nur ein Drittel dieser Zellen zusätzlich auch IFN γ produzieren (Abbildung 26).

Es ist bekannt, dass unterschiedliche, vom Tumor produzierte Substanzen, die T-Zellreaktivität direkt oder auch indirekt beeinflussen können (Taylor *et al.*, 2001; Smyth *et al.*, 2001). Immunsuppressive Zytokine wie TGF β und IL10 können ebenfalls vom Tumor

produziert werden und die Reaktivität der Tumor-spezifischen T-Zellen unterdrücken (Mullins *et al.*, 2001). Des weiteren führt die Herunterregulation von MHC I Molekülen und Tumorantigenen auf Tumorseite zu einer verminderten T-Zellantwort und somit zu einer ineffektiven Immunantwort gegen den Tumor (Ferrone *et al.*, 1995). Unsere Ergebnisse zeigten, dass Tumorzellen, die öfters passagiert wurden zu einer schwächeren Aktivierung der spezifischen T-Zellen führten (Abbildung 26). Ebenfalls konnte in der vorliegenden Arbeit mittels tetramerer Tumor-antigenspezifischer MHC-Molekülen gezeigt werden, dass eine hohe Frequenz von Antigen-spezifischen T-Zellen bei den vakzinierten Melanompatienten vorhanden war, jedoch nicht alle dieser Zellen aktivierbar waren. Die hohe Zytotoxizität, die von den reaktiven Antigen-spezifischen T-Zellen *in vitro* gezeigt wurde, könnte *in vivo* durch suppressive Faktoren aus dem Tumor unterdrückt worden sein. Gleichfalls problematisch für die Bekämpfung des Tumors ist die Tumorgroße. Genauso wie bei der Peptid-Vakzination, war die Patientengruppe, die mit der Hybridzell-Vakzine behandelt wurden, in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass trotz einer hohen Anzahl an Tumor-spezifischen T-Zellen die Tumormasse dadurch nicht erheblich reduziert werden kann.

5.5 Antigen-spezifische T-Zellen bei unbehandelten Melanompatienten

Bei drei der sechs Melanompatienten, die noch keine Therapie erhalten hatten, wurde eine hohe Anzahl von Antigen-spezifischen T-Zellen im Tumor identifiziert, jedoch nicht im peripheren Blut. Anhand der immunhistologischen Färbungen zeigte sich, dass das T-Zellinfiltrat am Rande der Tumoreareale lokalisiert war. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass immunsuppressive Substanzen aus dem Tumor oder Anergiemechanismen die Aktivität der Tumor-spezifischen T-Zellen hemmen können. Jedoch könnten auch regulatorische Mechanismen in der Entwicklung der anti-Tumorantwort eine Rolle spielen. Die meisten Tumorantigene sind körpereigene, nicht-mutierte Proteine und T-Zellen die gegen diese Proteine eine Reaktivität zeigen, wurden sowohl bei Tumorpatienten als auch bei gesunden Personen gefunden (Smyth *et al.*, 2001). Beobachtungen an spontanen Tumorregressionen oder erfolgreichen Immuntherapien zeigten in einigen Fällen das Auftreten von Autoimmunreaktionen (z. B. Vitiligo bei Regression von Melanomen). Folglich ist eine Anti-Tumorantwort mit einer Auto-Immunantwort eng verknüpft. Kürzlich veröffentlichte Daten zeigen, dass bestimmte regulatorische T-Zellen wie NKT Zellen und CD25⁺CD4⁺ T-Zellen eine Auto-Immunantwort verhindern und durch indirekte Interaktionen mit CTL bei Tumorpatienten auch Reaktionen gegen Tumoren unterdrücken (Terabe *et al.*, 2000; Kuniyasu *et al.*, 2000).

Melan A/MART-1 spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden von Pittet und Kollegen in einer Frequenz von bis zu 0,07% bei gesunden Kontrollpersonen mittels tetramerer MHC-

Molekülen gefunden (Pittet *et al.*, 1999). Die Frequenz Melan A/MART-1-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut von Melanompatienten lag mit 0,1% bei diesen Untersuchungen in einem ähnlichen Bereich. Die phänotypischen Untersuchungen zeigten, dass diese Zellen in den gesunden Probanden im Gegensatz zu den Melan A/MART-1-spezifischen Zellen in Melanompatienten einen naiven Phänotyp aufwiesen. Hingegen waren mit der Expression von IFN γ , Perforin, einer niedrigen CD45RA-Expression und dem Verlust von CCR7 diese Zellen in den Tumorpatienten einem differenzierten Effektor-Typ zuzuordnen (Pittet *et al.*, 2002). Hiermit wird hervorgehoben, dass bei Zellen, die spezifisch für ein körpereigenes Antigen sind in Tumorpatienten die natürliche Ignoranz dieser Zellen durchbrochen werden kann und eine Reaktion gegen Tumorzellen, die dieses Antigen exprimieren, ermöglicht werden kann.

Generell zeigten die Frequenzanalysen bei unbehandelten Melanompatienten, dass auch zu Beginn der Erkrankung Antigen-spezifische T-Zellen im Tumor vorhanden sind und diese Zellen potentiell aktivierbar sind. Für die Behandlung der Tumorpatienten wäre es demnach vorteilhafter eine Immuntherapie zu erhalten bevor Anergiemechanismen von Seiten des Tumors die spezifischen T-Zellen beeinflussen können.

Für eine effiziente Tumorbekämpfung sollten möglichst alle regulatorischen und suppressiven Mechanismen des Immunsystems und des Tumors in Betracht gezogen werden. Eine erfolgreiche Immuntherapie sollte durch stimulierende Signale den Tumor für das Immunsystem „sichtbar“ machen, in dem die Toleranz des Immunsystems gegenüber autologen Tumorantigenen durchbrochen wird. In der Literatur wird häufig über die Notwendigkeit eines sogenannten „danger“ Signals diskutiert, das zur Aktivierung des Immunsystems führt (Fuchs *et al.*, 1996). Für die Auslösung einer Immunantwort gegen den Tumor können unspezifische, körperfremde Stimuli in Zusammenhang mit Tumorspezifischen Antigenen eine optimale Kombination bilden und zur Durchbrechung der Toleranz gegen Tumorantigene führen. Die in der vorliegenden Arbeit bei Melanompatienten eingesetzten Vakzinationstherapien zeigen, dass sowohl die Peptid-Vakzination in Kombination mit *Recall*-Antigenen als auch die Hybridzell-Vakzination zumindest zur Stabilisierung des Krankheitszustandes bei den behandelten Patienten führte. Bei einem Patienten wurde nach Hybridzell-Vakzination eine komplette Remission der noch vorhandenen Metastasen beobachtet.

5.6 Bedeutung der Frequenzanalyse Antigen-spezifischer T-Zellen

Die gezielte Entwicklung von Vakzinationsstrategien bei Krebs erfordert die genaue Untersuchung des Immungeschehens bei Tumorpatienten auf zellulärer und molekularer

Ebene. Insbesondere gilt es Tumor-spezifische zytotoxische T-Zellen zu identifizieren und hinsichtlich ihrer Frequenz, ihres Phänotyps, ihres physiologischen Zustands und ihres Reaktionsvermögens zu untersuchen, um das Verhältnis zwischen Tumor und Immunsystem zu verstehen und die Effekte eines Immuntherapieansatzes zu analysieren. Mit der Analyse reaktiver CTL können die Chancen einer Immuntherapie eingeschätzt und die Effizienz der Therapie im Verlauf evaluiert werden. Die Quantifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen ist mit der Identifizierung Tumor-assoziiierter Antigene und entsprechender T-Zellepitope und der Entwicklung von neuen Analyseverfahren wesentlich verbessert worden. In der vorliegenden Arbeit wurden bei der Mehrzahl der untersuchten Melanompatienten sowohl im peripheren Blut als auch im Tumor mit Hilfe der Durchflusszytometrie Antigen-spezifische T-Zellen nachgewiesen.

Bisher wurden verschiedene Arten der Frequenzbestimmung von Antigen-spezifischen T-Zellen angewandt. In Abhängigkeit von der verwendeten Technik reflektieren sie die Frequenz *in vivo* mehr oder weniger gut. In früheren Arbeiten wurden vor allem Limiting Dilution assays (LDA; Coulie *et al.*, 1992) oder ELISPOT-Techniken (eng., enzyme linked immunospot; Pass *et al.*, 1998) als Maß für die Frequenz von spezifisch-reagierenden T-Zellen benutzt. Beide Verfahren basieren auf der Kultivierung der zu untersuchenden Zellen für einen Zeitraum von mehreren Tagen bis zu mehreren Wochen und sind stark von der Aktivierbarkeit der Zellen abhängig. Es besteht daher die Gefahr, dass durch die Kultivierungsphase Veränderungen in den Zellen hervorgerufen werden, die Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation verfälschen. Eigene Erfahrungen zeigten, dass die Kulturbedingungen (z.B. die verwendete FCS-Charge, IL-2) einen starken, antigenunabhängigen Einfluss auf die Frequenzbestimmung und die Expression bestimmter Oberflächenmarker haben. So exprimierten, für einen längeren Zeitraum mit IL-2 kultivierte T-Zellen auch ohne Antigen-Stimulation die Marker CD45RO, CD25, CD69 und CD44.

Die Entwicklung von tetrameren MHC-Molekülen hat zum ersten Mal Frequenzanalysen ermöglicht, die ein reales Abbild der *in vivo* vorkommenden Antigen-spezifischen T-Zellen geben (Altmann *et al.*, 1996). Diese Moleküle werden mit spezifischen Peptiden beladen und analog zu Antikörpern für die Färbung von Zellen eingesetzt. Die fluoreszenz-markierten MHC-Peptid-Komplexe binden an den entsprechenden T-Zellrezeptor und ermöglichen die Bestimmung der Tetramer-gefärbten Zellen am Durchflußzytometer. Da die Zellen nicht kultiviert werden müssen, sondern direkt nach der PBMC-Isolation untersucht werden, reflektieren sie die Frequenz der spezifischen T-Zellen in der Testquelle. Tan und Kollegen konnten bei dem Vergleich von drei verschiedenen Techniken (LDA, ELISPOT und tetrameren MHC-Molekülen) bei gleichen Ausgangsproben Frequenzunterschiede von bis zu

1:40 ermitteln (Tan *et al.*, 1999); im Durchschnitt lag die Frequenzbestimmung mit tetrameren MHC-Molekülen 4,4-fach bzw. 23,3-fach höher als mit der ELISPOT- bzw. der LDA-Technik. Die mit Tetrameren bestimmten Frequenzen liegen damit deutlich höher als die mit den bislang verwendeten Verfahren bestimmten Zahlen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Untersuchungen bei akuten Virus-Infektionen erzielt. Murali-Krishna und Mitarbeiter (Murali-Krishna *et al.*, 1998) haben bei der Bestimmung Virus-spezifischer T-Zellen mit tetrameren MHC-Molekülen 20- bis 100-fach höhere Frequenzen an Virus-spezifischen CD8⁺ Zellen ermittelt als mit der *Limiting Dilution* Methode.

Frequenzbestimmungen mit tetrameren MHC-Komplexen wurden zuerst bei Virus-infizierten Patienten durchgeführt (Altmann *et al.*, 1996). In der Zwischenzeit wurden tetramere MHC-Peptid-Komplexe auch zur Identifizierung Tumor-spezifischer T-Zellen genutzt (Lee *et al.*, 1999; Scheibenbogen *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden Melan A/MART-1 beladene Tetramere bei einem Hybridzell-vakzinierten Melanompatienten eingesetzt. Die Frequenzen der identifizierten, für dieses Antigen spezifischen T-Zellen im peripheren Blut, lagen mit 10-11% der gesamten CD8⁺ T-Zellen etwas höher, als die bis jetzt in der Literatur berichteten Werte. Der Vorteil von tetrameren MHC-Molekülen ist, dass auch nicht aktivierbare, anerge Antigen-spezifische T-Zellen identifiziert werden können.

Zur Bestimmung der Frequenz aktiver, Antigen-spezifischer T-Zellen wurde in dieser Arbeit die Strategie von Kern und Kollegen, der Epitop-Kartierung bekannter Antigene (Kern *et al.*, 1998), im Tumormodell etabliert. Die Inkubation von T-Zellen aus dem peripheren Blut oder aus Tumoren von Melanompatienten mit Melanom-spezifischen T-Zellepitopen erfolgt zwar unter Kulturbedingungen, aber bereits nach 5-6 h werden die Zellen auf spezifisch produzierte Zytokine analysiert, so dass negative Einflüsse der Kultur minimiert werden. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten, dass für das Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ Epitop der größte Teil der Tetramer positiven T-Zellen auch IFN γ produzieren konnte. Im Gegensatz dazu waren für das Melan A/MART 1₂₇₋₃₅ Epitop nur ein Fünftel der Tetramer positiven T-Zellen aktivierbar.

Mit dem Verfahren der intrazellulären IFN γ -Färbung wurden die T-Zellen identifiziert, die funktionelle Kapazität besitzen und nach spezifischer Stimulation IFN γ produzierten. Insbesondere in der Tumorsituation sind funktionelle Defekte und reduzierte funktionelle Kapazität von Tumor-spezifischen T-Zellen beschrieben worden. Solche Zellen lassen sich nicht im funktionellen Test über den Nachweis der IFN γ -Produktion nachweisen. Der Einsatz von tetrameren MHC-Molekülen, die mit spezifischen Peptiden beladen sind, ermöglichte es,

solche Zellen zu identifizieren, die spezifisch für das entsprechende Epitop sind, aber nicht reagieren können. Für eine Aussage, sowohl über die Frequenz als auch über die funktionelle Kapazität der spezifischen T-Zellen, ist eine Kombination beider Verfahren notwendig.

Die bislang veröffentlichten Daten über Antigen-spezifische T-Zellen bei Tumorkranken sind Ergebnisse, die meist bei Untersuchungen von einzelnen Patienten gewonnen wurden. Umfassende phänotypische und funktionelle Untersuchungen der Antigen-spezifischen T-Zellen von Tumor-Patienten, kombiniert mit *ex vivo* funktionellen Studien, sind bislang ebenfalls nur vereinzelt berichtet worden. Des Weiteren ist die systematische Analyse von Immuntherapieansätzen in dieser Hinsicht bislang unzureichend. Um die weltweit bei Tumorkranken eingesetzten Immuntherapien auf ihre Effizienz untereinander vergleichbar zu machen, wären einheitliche Methoden in der Frequenzbestimmung von Antigen-spezifischen T-Zellen als immunologische Antwort auf die Therapie notwendig.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frequenz der Tumor-spezifischen T-Zellen bei Melanompatienten unter Immuntherapie untersucht sowie der Phänotyp und die Funktionalität dieser Zellen analysiert.

Für die Induktion einer spezifischen Immunantwort wurden zwei unterschiedliche Vakzinationsansätze konzipiert: eine nicht-zelluläre Vakzine aus Melanom-assoziierten Peptiden in Kombination mit ubiquitären *Recall*-Antigenen, wodurch entsprechende CD4⁺ T-Zellen in ihrer Helferfunktion die Peptid-spezifischen CTL unterstützen sollten, sowie eine zelluläre Vakzine aus Hybridzellen, die durch die Fusion von autologen Tumorzellen mit allogenen dendritischen Zellen generiert wurden. Die Evaluation der Therapien erfolgte sowohl über klinische Parameter als auch über die Untersuchung der spezifischen Immunreaktion der Patienten. Für letztere wurden die Frequenzen der Peptid-spezifischen CTLs und der Helfer-Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut der behandelten Patienten bestimmt. Der Nachweis erfolgte mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung nach Restimulation der PBMCs mit den entsprechenden Peptiden bzw. Antigenen und anschließender FACS-Analyse zur Ermittlung der Frequenzen spezifisch reagierender T-Zellen. Es wurden zwei HLA-A1 restringierte Peptide der Melanom-assoziierten Antigene MAGE-1 und MAGE-3 sowie 9 HLA-A2 restringierte Peptide der Antigene MAGE-3, Melan A/MART-1, Tyrosinase und gp100 verwendet. Vor der Vakzination wurde das Tumormaterial der Patienten immunhistologisch auf das Vorkommen der Tumor-Antigene untersucht.

Bei der Peptid-Vakzinationsstudie wurden vier Melanompatienten im Krankheitsstadium IV mit Melanom-assoziierten Peptiden in Kombination mit Helfer-Antigenen vakziniert. Als T-Helfer-Antigene dienten die *Recall*-Antigene aus dem Merieux-TestTM. Die *Recall*-Antigene, auf die die Patienten in einem Stempeltest vor Beginn der Therapie eine Reaktion zeigten, wurden zusammen mit den Melanom-Peptiden intrakutan injiziert. Bei einem der vier Patienten wurde ein 7facher Anstieg der Frequenz der Proteus-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut nach Vakzination mit diesem Antigen festgestellt, während die Frequenz der Tuberkulin-spezifischen T-Zellen unverändert blieb. Bei den anderen Patienten konnten keine T-Helferantigen spezifischen T-Zellen im peripheren Blut detektiert werden. Die Frequenz der Peptid-spezifischen CD3⁺/CD8⁺ IFN γ -produzierenden T-Zellen lag im peripheren Blut nach Vakzination zwischen 0,01 und 1,25% bezogen auf die gesamte CD3⁺/CD8⁺-Population. Bei drei der vier Patienten zeigte sich eine Korrelation zwischen Expression von Tumorantigenen im untersuchten Tumormaterial und Frequenz der Peptid-

spezifischen T-Zellen im peripheren Blut nach Vakzination. Es konnte jedoch keine Korrelation mit dem klinischen Zustand der Patienten gefunden werden.

Mit der Hybridzell-Vakzine wurden sechs Melanompatienten im Krankheitsstadium III und IV behandelt. Durch diese Therapie konnte bei einem Patienten eine komplette Remission erzielt werden. Drei Patienten zeigten eine Stabilisierung der Krankheit über mehrere Monate und zwei Patienten waren progredient. Die Frequenzwerte der reaktiven Peptid-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut lagen bei diesen Patienten nach Vakzination zwischen 0,01% und 6,5% bezogen auf die gesamten CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen. Die induzierte Immunantwort korrelierte jedoch nicht mit dem klinischen Zustand der Patienten. Auffällig war im Falle der vollständigen Tumorregression die hohe Expression von Tumorantigenen im Tumor und die hohe Frequenz voraktivierter CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut.

Bei zwei Patienten erfolgte eine phänotypische Charakterisierung zirkulierender Peptid-spezifischer T-Zellen kombiniert mit tetramerisierten, Peptid-beladenen MHC-I-Molekülen und funktionellen Analysen. Es konnte gezeigt werden, dass nicht alle Tumor-spezifischen T-Zellen aktivierbar waren. Die Färbung mit den Melan A/MART 1₂₆₋₃₅ –beladenen tetrameren MHC-Molekülen ergab, dass bei einem Patienten 10% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen positiv für dieses Peptid waren. Jedoch konnten nur 50% dieser Zellen nach Peptid-Stimulation IFN γ produzieren. Für das Peptid Melan A/MART 1₂₇₋₃₅ waren 11% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen spezifisch und nur ein Fünftel davon waren aktivierbar.

Sowohl die aktivierbaren Peptid-spezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut als auch die aus dem Tumor zeigten eine hohe lytische Kapazität im ⁵¹Cr-Freisetzungsversuch. Diese Zellen exprimierten Perforin, den Aktivierungsmarker CD69 und CD44. Sie konnten einem enddifferenzierten Zelltyp mit Effektorfunktion zugeordnet werden. Die Peptid-spezifischen CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen waren partiell positiv für CD45RA, exprimierten den NK-Zellmarker CD57, den KIR-Marker CD94 und waren negativ in der Expression von CD28, CD27, CD45RO und Ki67.

Interessanterweise wurden bei drei der sechs untersuchten, unbehandelten Melanompatienten hohe Frequenzen an Peptid-spezifischen T-Zellen im Tumor (bis zu 2,8% der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen) gemessen, jedoch nicht im peripheren Blut. Diese Ergebnisse verdeutlichen noch mal, dass Frequenzanalysen Antigen-spezifischer T-Zellen idealer Weise im Tumor, peripheren Blut und Lymphknoten durchgeführt werden müssten. Für eine Aussage, sowohl über die Frequenz als auch über die funktionelle Kapazität der spezifischen T-Zellen, ist eine Kombination der intrazellulären IFN γ -Messung mit der Tetramer-Färbung notwendig. Die Anwendung dieser Technik wäre für die Standardisierung der Evaluation von Immuntherapien hilfreich.

6. Literatur

- Adorini, L. (1993). "Selective inhibition of T cell responses by protein and peptide-based immunotherapy." *Clin. Exp. Rheumatol.*, 11 Suppl 8, S41-S44.
- Agarwala, S. S. and Kirkwood, J. M. (1998). "Adjuvant therapy of melanoma." *Semin. Surg. Oncol.*, 14(4), 302-310.
- Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., and Davis, M. M. (1996). "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes." *Science*, 274(5284), 94-96.
- Anichini, A., Maccalli, C., Mortarini, R., Salvi, S., Mazzocchi, A., Squarcina, P., Herlyn, M., and Parmiani, G. (1993). "Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients." *J. Exp. Med.*, 177(4), 989-998.
- Anichini, A., Mortarini, R., Maccalli, C., Squarcina, P., Fleischhauer, K., Mascheroni, L., and Parmiani, G. (1996). "Cytotoxic T cells directed to tumor antigens not expressed on normal melanocytes dominate HLA-A2.1-restricted immune repertoire to melanoma." *J. Immunol.*, 156(1), 208-217.
- Anichini, A., Molla, A., Mortarini, R., Tragni, G., Bersani, I., Di Nicola, M., Gianni, A. M., Pilotti, S., Dunbar, R., Cerundolo, V., and Parmiani, G. (1999). "An expanded peripheral T cell population to a cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined, melanocyte-specific antigen in metastatic melanoma patients impacts on generation of peptide-specific CTLs but does not overcome tumor escape from immune surveillance in metastatic lesions." *J. Exp. Med.*, 190(5), 651-667.
- Assenmacher, M., Schmitz, J., and Radbruch, A. (1994). "Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells." *Eur. J. Immunol.*, 24(5), 1097-1101.
- Assenmacher, M., Lohning, M., Scheffold, A., Richter, A., Miltenyi, S., Schmitz, J., and Radbruch, A. (1998). "Commitment of individual Th1-like lymphocytes to expression of IFN-gamma versus IL-4 and IL-10: selective induction of IL-10 by sequential stimulation of naive Th cells with IL-12 and IL-4." *J. Immunol.*, 161(6), 2825-2832.
- Bachmann, M. F., Sebzda, E., Kundig, T. M., Shahinian, A., Speiser, D. E., Mak, T. W., and Ohashi, P. S. (1996). "T cell responses are governed by avidity and co-stimulatory thresholds." *Eur. J. Immunol.*, 26(9), 2017-2022.
- Bakker, A. B., Phillips, J. H., Figdor, C. G., and Lanier, L. L. (1998). "Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL." *J. Immunol.*, 160(11), 5239-5245.
- Barker, C. F. and Billingham, R. E. (1977). "Immunologically privileged sites." *Adv. Immunol.*, 25, 1-54.
- Bartkova, J., Lukas, J., Guldberg, P., Alsner, J., Kirkin, A. F., Zeuthen, J., and Bartek, J. (1996). "The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis." *Cancer Res.*, 56(23), 5475-5483.
- Bastuji-Garin, S. and Diepgen, T. L. (2002). "Cutaneous malignant melanoma, sun exposure, and sunscreen use: epidemiological evidence." *Br. J. Dermatol.*, 146 Suppl 61, 24-30.
- Baurain, J. F., Colau, D., van Baren, N., Landry, C., Martelange, V., Vikkula, M., Boon, T., and Coulie, P. G. (2000). "High frequency of autologous anti-melanoma CTL directed against an antigen generated by a point mutation in a new helicase gene." *J. Immunol.*, 164(11), 6057-6066.

- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." *Nature*, 393(6684), 478-480.
- Bennink, J. R., Anderson, R., Bacik, I., Cox, J., Day, P., Deng, Y., Lapham, C., Link, H., Russ, G., and Yewdell, J. W. (1993). "Antigen processing: where tumor-specific T-cell responses begin." *J. Immunother.*, 14(3), 202-208.
- Boon, T. (1993). "Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes: present perspectives for specific immunotherapy." *Int. J. Cancer*, 54(2), 177-180.
- Bouchard, B., Fuller, B. B., Vijayaswaradhi, S., and Houghton, A. N. (1989). "Induction of pigmentation in mouse fibroblasts by expression of human tyrosinase cDNA." *J. Exp. Med.*, 169(6), 2029-2042.
- Bouwes Bavinck, J. N., Hardie, D. R., Green, A., Cutmore, S., MacNaught, A., O'Sullivan, B., Siskind, V., Van Der Woude, F. J., and Hardie, I. R. (1996). "The risk of skin cancer in renal transplant recipients in Queensland, Australia. A follow-up study." *Transplantation*, 61(5), 715-721.
- Brasseur, F., Marchand, M., Vanwijck, R., Herin, M., Lethe, B., Chomez, P., and Boon, T. (1992). "Human gene MAGE-1, which codes for a tumor-rejection antigen, is expressed by some breast tumors." *Int. J. Cancer*, 52(5), 839-841.
- Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and McMichael, A. J. (1998). "HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C." *Nature*, 391(6669), 795-799.
- Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., De Plaen, E., Lethe, B., Coulie, P., and Boon, T. (1993). "The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas." *J. Exp. Med.*, 178(2), 489-495.
- Brichard, V. G., Herman, J., Van Pel, A., Wildmann, C., Gaugler, B., Wolfel, T., Boon, T., and Lethe, B. (1996). "A tyrosinase nonapeptide presented by HLA-B44 is recognized on a human melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes." *Eur. J. Immunol.*, 26(1), 224-230.
- Bucy, R. P., Panoskaltsis-Mortari, A., Huang, G. Q., Li, J., Karr, L., Ross, M., Russell, J. H., Murphy, K. M., and Weaver, C. T. (1994). "Heterogeneity of single cell cytokine gene expression in clonal T cell populations." *J. Exp. Med.*, 180(4), 1251-1262.
- Carreno, B. M. and Collins, M. (2002). "The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses." *Annu. Rev. Immunol.*, 20, 29-53.
- Carter, L. L., Zhang, X., Dubey, C., Rogers, P., Tsui, L., and Swain, S. L. (1998). "Regulation of T cell subsets from naive to memory." *J. Immunother.*, 21(3), 181-187.
- Chakraborty, N. G. and Mukherji, B. (1998). "Human melanoma-specific, noncytolytic CD8+ T cells that can synthesize type I cytokine." *Cancer Res.*, 58(7), 1363-1366.
- Chambers, C. A., Kuhns, M. S., Egen, J. G., and Allison, J. P. (2001). "CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy." *Annu. Rev. Immunol.*, 19, 565-594.
- Champagne, P., Ogg, G. S., King, A. S., Knabenhans, C., Ellefsen, K., Nobile, M., Appay, V., Rizzardi, G. P., Fleury, S., Lipp, M., Forster, R., Rowland-Jones, S., Sekaly, R. P., McMichael, A. J., and Pantaleo, G. (2001). "Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes." *Nature*, 410(6824), 106-111.
- Chen, L., McGowan, P., Ashe, S., Johnston, J., Li, Y., Hellstrom, I., and Hellstrom, K. E. (1994). "Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity." *J. Exp. Med.*, 179(2), 523-532.

- Chen, Q., Daniel, V., Maher, D. W., and Hersey, P. (1994). "Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma." *Int. J. Cancer*, 56(5), 755-760.
- Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L. J. (1997). "A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 94(5), 1914-1918.
- Ciubotariu, R., Colovai, A. I., Pennesi, G., Liu, Z., Smith, D., Berlocco, P., Cortesini, R., and Suciufoca, N. (1998). "Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+." *J. Immunol.*, 161(10), 5193-5202.
- Constant, S., Sant'Angelo, D., Pasqualini, T., Taylor, T., Levin, D., Flavell, R., and Bottomly, K. (1995). "Peptide and protein antigens require distinct antigen-presenting cell subsets for the priming of CD4+ T cells." *J. Immunol.*, 154(10), 4915-4923.
- Cormier, J. N., Salgaller, M. L., Prevette, T., Barracchini, K. C., Rivoltini, L., Restifo, N. P., Rosenberg, S. A., and Marincola, F. M. (1997). "Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A." *Cancer J. Sci. Am.*, 3(1), 37-44.
- Coulie, P. G., Somville, M., Lehmann, F., Hainaut, P., Brasseur, F., Devos, R., and Boon, T. (1992). "Precursor frequency analysis of human cytolytic T lymphocytes directed against autologous melanoma cells." *Int. J. Cancer*, 50(2), 289-297.
- Coulie, P. G., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J. P., and . (1994). "A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas." *J. Exp. Med.*, 180(1), 35-42.
- Coulie, P. G., Lehmann, F., Lethe, B., Herman, J., Lurquin, C., Andrawiss, M., and Boon, T. (1995). "A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 92(17), 7976-7980.
- Cox, A. L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R. A., Darrow, T. L., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D. F., and Slingluff, C. L., Jr. (1994). "Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines." *Science*, 264(5159), 716-719.
- Czerkinsky, C., Andersson, G., Ekre, H. P., Nilsson, L. A., Klareskog, L., and Ouchterlony, O. (1988). "Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells." *J. Immunol. Methods*, 110(1), 29-36.
- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J. J., Szikora, J. P., De Smet, C., Brasseur, F., van der, B. P., Lethe, B., Lurquin, C., and . (1994). "Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family." *Immunogenetics*, 40(5), 360-369.
- De Smet, C., Lurquin, C., van der, B. P., De Plaen, E., Brasseur, F., and Boon, T. (1994). "Sequence and expression pattern of the human MAGE2 gene." *Immunogenetics*, 39(2), 121-129.
- De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., and Boon, T. (1996). "The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 93(14), 7149-7153.
- Di Somma, M. M., Somma, F., Montani, M. S., Mangiacasale, R., Cundari, E., and Piccolella, E. (1999). "TCR engagement regulates differential responsiveness of human memory T cells to Fas (CD95)-mediated apoptosis." *J. Immunol.*, 162(7), 3851-3858.
- Diepgen, T. L. and Mahler, V. (2002). "The epidemiology of skin cancer." *Br. J. Dermatol.*, 146 Suppl 61, 1-6.

- DiMolfetto, L., Neal, H. A., Wu, A., Reilly, C., and Lo, D. (1998). "The density of the class II MHC T cell receptor ligand influences IFN-gamma/IL-4 ratios in immune responses in vivo." *Cell Immunol.*, 183(1), 70-79.
- Dummer, W., Becker, J. C., Schwaaf, A., Leverkus, M., Moll, T., and Brocker, E. B. (1995). "Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma." *Melanoma Res.*, 5(1), 67-68.
- Dworacki, G., Meidenbauer, N., Kuss, I., Hoffmann, T. K., Gooding, W., Lotze, M., and Whiteside, T. L. (2001). "Decreased zeta chain expression and apoptosis in CD3+ peripheral blood T lymphocytes of patients with melanoma." *Clin. Cancer Res.*, 7(3 Suppl), 947s-957s.
- Effros, R. B., Allsopp, R., Chiu, C. P., Hausner, M. A., Hirji, K., Wang, L., Harley, C. B., Villeponteau, B., West, M. D., and Giorgi, J. V. (1996). "Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis." *AIDS*, 10(8), F17-F22.
- Elson, L. H., Nutman, T. B., Metcalfe, D. D., and Prussin, C. (1995). "Flow cytometric analysis for cytokine production identifies T helper 1, T helper 2, and T helper 0 cells within the human CD4+." *J. Immunol.*, 154(9), 4294-4301.
- Esser, M. T., Haverstick, D. M., Fuller, C. L., Gullo, C. A., and Braciale, V. L. (1998). "Ca²⁺ signaling modulates cytolytic T lymphocyte effector functions." *J. Exp. Med.*, 187(7), 1057-1067.
- Ferrarini, M., Imro, M. A., Sciorati, C., Heltai, S., Protti, M. P., Pellicciari, C., Rovere, P., Manfredi, A. A., and Rugarli, C. (1999). "Blockade of the Fas-triggered intracellular signaling pathway in human melanomas is circumvented by cytotoxic lymphocytes." *Int. J. Cancer*, 81(4), 573-579.
- Ferrone, S. and Marincola, F. M. (1995). "Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance." *Immunol. Today*, 16(10), 487-494.
- Fitzgerald, J. E., Ricalton, N. S., Meyer, A. C., West, S. G., Kaplan, H., Behrendt, C., and Kotzin, B. L. (1995). "Analysis of clonal CD8+ T cell expansions in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis." *J. Immunol.*, 154(7), 3538-3547.
- Fuchs, E. J. and Matzinger, P. (1996). "Is cancer dangerous to the immune system?" *Semin. Immunol.*, 8(5), 271-280.
- Germann, T., Gately, M. K., Schoenhaut, D. S., Lohoff, M., Mattner, F., Fischer, S., Jin, S. C., Schmitt, E., and Rude, E. (1993). "Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells." *Eur. J. Immunol.*, 23(8), 1762-1770.
- Gervois, N., Guilloux, Y., Diez, E., and Jotereau, F. (1996). "Suboptimal activation of melanoma infiltrating lymphocytes (TIL) due to low avidity of TCR/MHC-tumor peptide interactions." *J. Exp. Med.*, 183(5), 2403-2407.
- Gilchrest, B. A., Eller, M. S., Geller, A. C., and Yaar, M. (1999). "The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation." *N. Engl. J. Med.*, 340(17), 1341-1348.
- Goodwin, R. G., Din, W. S., Davis-Smith, T., Anderson, D. M., Gimpel, S. D., Sato, T. A., Maliszewski, C. R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and . (1993). "Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor." *Eur. J. Immunol.*, 23(10), 2631-2641.
- Grohmann, U., Fioretti, M. C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Ayroldi, E., Surace, D., Silla, S., and Puccetti, P. (1998). "Dendritic cells, interleukin 12, and CD4+ lymphocytes in the initiation of class I-restricted reactivity to a tumor/self peptide." *Crit Rev. Immunol.*, 18(1-2), 87-98.

- Grossman, Z. and Singer, A. (1996). "Tuning of activation thresholds explains flexibility in the selection and development of T cells in the thymus." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(25), 14747-14752.
- Guilloux, Y., Lucas, S., Brichard, V. G., Van Pel, A., Viret, C., De Plaen, E., Brasseur, F., Lethe, B., Jotereau, F., and Boon, T. (1996). "A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene." *J. Exp. Med.*, 183(3), 1173-1183.
- Guo, Y., Wu, M., Chen, H., Wang, X., Liu, G., Li, G., Ma, J., and Sy, M. S. (1994). "Effective tumor vaccine generated by fusion of hepatoma cells with activated B cells." *Science*, 263(5146), 518-520.
- Gong, J., Nikrui, N., Chen, D., Koido, S., Wu, Z., Tanak, Y., Cannistra, S., Avigan, D., Kufe, D. (2000) "Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity." *J Immunol.*, 165(3):1705-11.
- Gong, J., Avigan D., Chen D., Wu Z., Koido S., Kashiwaba M., Kufe D. "Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells." (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14;97(6):2715-8.
- Tanaka, Y., Koido, S., Chen, D., Gendler, S., Kufe, D., Gong, J. (2001) "Vaccination with allogeneic dendritic cells fused to carcinoma cells induces antitumor immunity in MUC1 transgenic mice." *Clin Immunol.*, 101(2):192-200.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., and Tschopp, J. (1996). "Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape." *Science*, 274(5291), 1363-1366.
- Halachmi, S. and Gilchrest, B. A. (2001). "Update on genetic events in the pathogenesis of melanoma." *Curr. Opin. Oncol.*, 13(2), 129-136.
- Hamann, D., Baars, P. A., Rep, M. H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S. R., Klein, M. R., and van Lier, R. A. (1997). "Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells." *J. Exp. Med.*, 186(9), 1407-1418.
- Hamann, D., Kostense, S., Wolthers, K. C., Otto, S. A., Baars, P. A., Miedema, F., and van Lier, R. A. (1999). "Evidence that human CD8+CD45RA+." *Int. Immunol.*, 11(7), 1027-1033.
- Henkart, P. A. (1985). "Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity." *Annu. Rev. Immunol.*, 3, 31-58.
- Hintzen, R. Q., de Jong, R., Lens, S. M., Brouwer, M., Baars, P., and van Lier, R. A. (1993). "Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes." *J. Immunol.*, 151(5), 2426-2435.
- Hishii, M., Kurnick, J. T., Ramirez-Montagut, T., and Pandolfi, F. (1999). "Studies of the mechanism of cytotoxicity by tumour-infiltrating lymphocytes." *Clin. Exp. Immunol.*, 116(3), 388-394.
- Holowachuk, E. W. and Ruhoff, M. S. (2001). "Restoration of abated T cell stimulation activity of mature dendritic cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285(3), 594-597.
- Houghton, J. A. (2001). "Developing novel and highly effective new therapeutic strategies for treatment of colorectal cancer: where do we go from here?" *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2(5), 674-676.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages." *Science*, 260(5107), 547-549.

- Huard, B. and Karlsson, L. (2000). "A subpopulation of CD8+ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptors (KIR) in healthy donors: evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance." *Eur. J. Immunol.*, 30(6), 1665-1675.
- Hunter, T. (1991). "Cooperation between oncogenes." *Cell*, 64(2), 249-270.
- Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroccek, R. A. (1999). "ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28." *Nature*, 397(6716), 263-266.
- Jager, D., Jager, E., and Knuth, A. (2001). "Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer." *J. Clin. Pathol.*, 54(9), 669-674.
- Jager, E., Ringhoffer, M., Dienes, H. P., Arand, M., Karbach, J., Jager, D., Ilseemann, C., Hagedorn, M., Oesch, F., and Knuth, A. (1996). "Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo." *Int. J. Cancer*, 67(1), 54-62.
- Jager, E., Chen, Y. T., Drijfhout, J. W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L. J., and Knuth, A. (1998). "Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes." *J. Exp. Med.*, 187(2), 265-270.
- Jager, E., Stockert, E., Zidianakis, Z., Chen, Y. T., Karbach, J., Jager, D., Arand, M., Ritter, G., Old, L. J., and Knuth, A. (1999). "Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events." *Int. J. Cancer*, 84(5), 506-510.
- Jager, E., Hohn, H., Necker, A., Forster, R., Karbach, J., Freitag, K., Neukirch, C., Castelli, C., Salter, R. D., Knuth, A., and Maeurer, M. J. (2002). "Peptide-specific CD8+ T-cell evolution in vivo: response to peptide vaccination with Melan-A/MART-1." *Int. J. Cancer*, 98(3), 376-388.
- Jager, E., Jager, D., and Knuth, A. (2002). "Clinical cancer vaccine trials." *Curr. Opin. Immunol.*, 14(2), 178-182.
- Jemal, A., Devesa, S. S., Hartge, P., and Tucker, M. A. (2001). "Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States." *J. Natl. Cancer Inst.*, 93(9), 678-683.
- June, C. H., Ledbetter, J. A., Linsley, P. S., and Thompson, C. B. (1990). "Role of the CD28 receptor in T-cell activation." *Immunol. Today*, 11(6), 211-216.
- Kaneko, H., Saito, K., Hashimoto, H., Yagita, H., Okumura, K., and Azuma, M. (1996). "Preferential elimination of CD28+ T cells in systemic lupus erythematosus (SLE) and the relation with activation-induced apoptosis." *Clin. Exp. Immunol.*, 106(2), 218-229.
- Kang, X., Kawakami, Y., el Gamil, M., Wang, R., Sakaguchi, K., Yannelli, J. R., Appella, E., Rosenberg, S. A., and Robbins, P. F. (1995). "Identification of a tyrosinase epitope recognized by HLA-A24-restricted, tumor-infiltrating lymphocytes." *J. Immunol.*, 155(3), 1343-1348.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Sakaguchi, K., Robbins, P. F., Rivoltini, L., Yannelli, J. R., Appella, E., and Rosenberg, S. A. (1994). "Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes." *J. Exp. Med.*, 180(1), 347-352.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Rivoltini, L., Topalian, S. L., Miki, T., and Rosenberg, S. A. (1994). "Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91(9), 3515-3519.

- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Sakaguchi, K., Appella, E., Yannelli, J. R., Adema, G. J., Miki, T., and Rosenberg, S. A. (1994). "Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91(14), 6458-6462.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., Kang, X., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Appella, E., and Rosenberg, S. A. (1995). "Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression." *J. Immunol.*, 154(8), 3961-3968.
- Kawakami, Y. and Rosenberg, S. A. (1996). "T-cell recognition of self peptides as tumor rejection antigens." *Immunol. Res.*, 15(3), 179-190.
- Kawakami, Y., Robbins, P. F., Wang, X., Tupesis, J. P., Parkhurst, M. R., Kang, X., Sakaguchi, K., Appella, E., and Rosenberg, S. A. (1998). "Identification of new melanoma epitopes on melanosomal proteins recognized by tumor infiltrating T lymphocytes restricted by HLA-A1, -A2, and -A3 alleles." *J. Immunol.*, 161(12), 6985-6992.
- Kern, F., Ode-Hakim, S., Vogt, K., Hoflich, C., Reinke, P., and Volk, H. D. (1996). "The enigma of CD57+." *Clin. Exp. Immunol.*, 104(1), 180-184.
- Kiessling, R., Kono, K., Petersson, M., and Wasserman, K. (1996). "Immunosuppression in human tumor-host interaction: role of cytokines and alterations in signal-transducing molecules." *Springer Semin. Immunopathol.*, 18(2), 227-242.
- Kishida, T., Asada, H., Satoh, E., Tanaka, S., Shinya, M., Hirai, H., Iwai, M., Tahara, H., Imanishi, J., and Mazda, O. (2001). "In vivo electroporation-mediated transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes induces significant antitumor effects against melanoma in mice." *Gene Ther.*, 8(16), 1234-1240.
- Kittlesen, D. J., Thompson, L. W., Gulden, P. H., Skipper, J. C., Colella, T. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Engelhard, V. H., Slingluff, C. L., Jr., and Shabanowitz, J. A. (1998). "Human melanoma patients recognize an HLA-A1-restricted CTL epitope from tyrosinase containing two cysteine residues: implications for tumor vaccine development." *J. Immunol.*, 160(5), 2099-2106.
- Kocher, T., Schultz-Thater, E., Gudat, F., Schaefer, C., Casorati, G., Juretic, A., Willmann, T., Harder, F., Heberer, M., and Spagnoli, G. C. (1995). "Identification and intracellular location of MAGE-3 gene product." *Cancer Res.*, 55(11), 2236-2239.
- Koh, H. K., Sinks, T. H., Geller, A. C., Miller, D. R., and Lew, R. A. (1993). "Etiology of melanoma." *Cancer Treat. Res.*, 65, 1-28.
- Kono, K., Salazar-Onfray, F., Petersson, M., Hansson, J., Masucci, G., Wasserman, K., Nakazawa, T., Anderson, P., and Kiessling, R. (1996). "Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell-and natural killer cell-mediated cytotoxicity." *Eur. J. Immunol.*, 26(6), 1308-1313.
- Kono, K., Takahashi, A., Amemiya, H., Ichihara, F., Sugai, H., Iizuka, H., Fujii, H., and Matsumoto, Y. (2002). "Frequencies of HER-2/neu overexpression relating to HLA haplotype in patients with gastric cancer." *Int. J. Cancer*, 98(2), 216-220.
- Koren, H. S., Ax, W., and Freund-Moelbert, E. (1973). "Morphological observations on the contact-induced lysis of target cells." *Eur. J. Immunol.*, 3(1), 32-37.
- Kuniyasu, Y., Takahashi, T., Itoh, M., Shimizu, J., Toda, G., and Sakaguchi, S. (2000). "Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation." *Int. Immunol.*, 12(8), 1145-1155.

- Kuss, I., Saito, T., Johnson, J. T., and Whiteside, T. L. (1999). "Clinical significance of decreased zeta chain expression in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer." *Clin. Cancer Res.*, 5(2), 329-334.
- Labarriere, N., Pandolfino, M. C., Raingeard, D., Le Guiner, S., Diez, E., Le Drian, E., Dreno, B., and Jotereau, F. (1998). "Frequency and relative fraction of tumor antigen-specific T cells among lymphocytes from melanoma-invaded lymph nodes." *Int. J. Cancer*, 78(2), 209-215.
- Lanier, L. L. (2001). "On guard--activating NK cell receptors." *Nat. Immunol.*, 2(1), 23-27.
- Lanzavecchia, A., Lezzi, G., and Viola, A. (1999). "From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior." *Cell*, 96(1), 1-4.
- Lee, K. H., Panelli, M. C., Kim, C. J., Riker, A. I., Bettinotti, M. P., Roden, M. M., Fetsch, P., Abati, A., Rosenberg, S. A., and Marincola, F. M. (1998). "Functional dissociation between local and systemic immune response during anti-melanoma peptide vaccination." *J. Immunol.*, 161(8), 4183-4194.
- Lee, K. H., Wang, E., Nielsen, M. B., Wunderlich, J., Migueles, S., Connors, M., Steinberg, S. M., Rosenberg, S. A., and Marincola, F. M. (1999). "Increased vaccine-specific T cell frequency after peptide-based vaccination correlates with increased susceptibility to in vitro stimulation but does not lead to tumor regression." *J. Immunol.*, 163(11), 6292-6300.
- Lee, P. P., Yee, C., Savage, P. A., Fong, L., Brockstedt, D., Weber, J. S., Johnson, D., Swetter, S., Thompson, J., Greenberg, P. D., Roederer, M., and Davis, M. M. (1999). "Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients." *Nat. Med.*, 5(6), 677-685.
- Lehmann, F., Marchand, M., Hainaut, P., Pouillart, P., Sastre, X., Ikeda, H., Boon, T., and Coulie, P. G. (1995). "Differences in the antigens recognized by cytolytic T cells on two successive metastases of a melanoma patient are consistent with immune selection." *Eur. J. Immunol.*, 25(2), 340-347.
- Leibson, P. J. (1997). "Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer." *Immunity.*, 6(6), 655-661.
- Lens, S. M., Baars, P. A., Hooibrink, B., van Oers, M. H., and van Lier, R. A. (1997). "Antigen-presenting cell-derived signals determine expression levels of CD70 on primed T cells." *Immunology*, 90(1), 38-45.
- Lens, S. M., Tesselaar, K., van Oers, M. H., and van Lier, R. A. (1998). "Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions." *Semin. Immunol.*, 10(6), 491-499.
- Lethe, B., van der, B. P., Brasseur, F., and Boon, T. (1997). "MAGE-1 expression threshold for the lysis of melanoma cell lines by a specific cytotoxic T lymphocyte." *Melanoma Res.*, 7 Suppl 2, S83-S88.
- Letsch, A., Keilholz, U., Schadendorf, D., Nagorsen, D., Schmittel, A., Thiel, E., and Scheibenbogen, C. (2000). "High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+ T cells in patients with advanced melanoma." *Int. J. Cancer*, 87(5), 659-664.
- Lewis, J. J., Janetzki, S., Schaed, S., Panageas, K. S., Wang, S., Williams, L., Meyers, M., Butterworth, L., Livingston, P. O., Chapman, P. B., and Houghton, A. N. (2000). "Evaluation of CD8(+) T-cell frequencies by the Elispot assay in healthy individuals and in patients with metastatic melanoma immunized with tyrosinase peptide." *Int. J. Cancer*, 87(3), 391-398.
- Libert, C., Vink, A., Coulie, P., Brouckaert, P., Everaerd, B., Van Snick, J., and Fiers, W. (1992). "Limited involvement of interleukin-6 in the pathogenesis of lethal septic shock as revealed by the effect of monoclonal antibodies against interleukin-6 or its receptor in various murine models." *Eur. J. Immunol.*, 22(10), 2625-2630.

- Liotta, L. A. and Kohn, E. C. (2001). "The microenvironment of the tumour-host interface." *Nature*, 411(6835), 375-379.
- Liu, Z., Tugulea, S., Cortesini, R., and Suciuc-Foca, N. (1998). "Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+." *Int. Immunol.*, 10(6), 775-783.
- Loftus, D. J., Castelli, C., Clay, T. M., Squarcina, P., Marincola, F. M., Nishimura, M. I., Parmiani, G., Appella, E., and Rivoltini, L. (1996). "Identification of epitope mimics recognized by CTL reactive to the melanoma/melanocyte-derived peptide MART-1(27-35)." *J. Exp. Med.*, 184(2), 647-657.
- Loftus, D. J., Squarcina, P., Nielsen, M. B., Geisler, C., Castelli, C., Odum, N., Appella, E., Parmiani, G., and Rivoltini, L. (1998). "Peptides derived from self-proteins as partial agonists and antagonists of human CD8+ T-cell clones reactive to melanoma/melanocyte epitope MART1(27-35)." *Cancer Res.*, 58(11), 2433-2439.
- Lucas, S., De Smet, C., Arden, K. C., Viars, C. S., Lethe, B., Lurquin, C., and Boon, T. (1998). "Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis." *Cancer Res.*, 58(4), 743-752.
- Lurquin, C., De Smet, C., Brasseur, F., Muscatelli, F., Martelange, V., De Plaen, E., Brasseur, R., Monaco, A. P., and Boon, T. (1997). "Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins." *Genomics*, 46(3), 397-408.
- Madrenas, J., Schwartz, R. H., and Germain, R. N. (1996). "Interleukin 2 production, not the pattern of early T-cell antigen receptor-dependent tyrosine phosphorylation, controls anergy induction by both agonists and partial agonists." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(18), 9736-9741.
- Mahanty, S., Mollis, S. N., Ravichandran, M., Abrams, J. S., Kumaraswami, V., Jayaraman, K., Ottesen, E. A., and Nutman, T. B. (1996). "High levels of spontaneous and parasite antigen-driven interleukin-10 production are associated with antigen-specific hyporesponsiveness in human lymphatic filariasis." *J. Infect. Dis.*, 173(3), 769-773.
- Malarkannan, S., Afkarian, M., and Shastri, N. (1995). "A rare cryptic translation product is presented by Kb major histocompatibility complex class I molecule to alloreactive T cells." *J. Exp. Med.*, 182(6), 1739-1750.
- Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M. H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bourlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P. Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P. G., van der, B. P., and Boon, T. (1999). "Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1." *Int. J. Cancer*, 80(2), 219-230.
- Marincola, F. M., Rivoltini, L., Salgaller, M. L., Player, M., and Rosenberg, S. A. (1996). "Differential anti-MART-1/MelanA CTL activity in peripheral blood of HLA-A2 melanoma patients in comparison to healthy donors: evidence of in vivo priming by tumor cells." *J. Immunother. Emphasis. Tumor Immunol.*, 19(4), 266-277.
- Mayrand, S. M. and Green, W. R. (1998). "Non-traditionally derived CTL epitopes: exceptions that prove the rules?" *Immunol. Today*, 19(12), 551-556.
- Mazzocchi, A., Belli, F., Mascheroni, L., Vegetti, C., Parmiani, G., and Anichini, A. (1994). "Frequency of cytotoxic T lymphocyte precursors (CTLp) interacting with autologous tumor via the T-cell receptor: limiting dilution analysis of specific CTLp in peripheral blood and tumor-invaded lymph nodes of melanoma patients." *Int. J. Cancer*, 58(3), 330-339.
- McCann, J. (1999). "Can skin cancers be minimized or prevented in organ transplant patients?" *J. Natl. Cancer Inst.*, 91(11), 911-913.

- Michie, C. A., McLean, A., Alcock, C., and Beverley, P. C. (1992). "Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms." *Nature*, 360(6401), 264-265.
- Mingari, M. C., Moretta, A., and Moretta, L. (1998). "Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses." *Immunol. Today*, 19(4), 153-157.
- Mingari, M. C., Ponte, M., Vitale, C., Bellomo, R., and Moretta, L. (2000). "Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function." *Hum. Immunol.*, 61(1), 44-50.
- Mortarini, R., Borri, A., Tragni, G., Bersani, I., Vegetti, C., Bajetta, E., Pilotti, S., Cerundolo, V., and Anichini, A. (2000). "Peripheral burst of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes and infiltration of metastatic lesions by memory CD8+ T cells in melanoma patients receiving interleukin 12." *Cancer Res.*, 60(13), 3559-3568.
- Moser, M. and Murphy, K. M. (2000). "Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development." *Nat. Immunol.*, 1(3), 199-205.
- Mugnaini, E. N., Egeland, T., Spurkland, A., and Brinchmann, J. E. (1999). "The T cell receptor repertoire of CD8+." *Clin. Exp. Immunol.*, 117(2), 298-303.
- Mulcahy, K. A., Rimoldi, D., Brasseur, F., Rodgers, S., Lienard, D., Marchand, M., Rennie, I. G., Murray, A. K., McIntyre, C. A., Platts, K. E., Leyvraz, S., Boon, T., and Rees, R. C. (1996). "Infrequent expression of the MAGE gene family in uveal melanomas." *Int. J. Cancer*, 66(6), 738-742.
- Mullins, D. W., Martins, R. S., Burger, C. J., and Elgert, K. D. (2001). "Tumor cell-derived TGF-beta and IL-10 dysregulate paclitaxel-induced macrophage activation." *J. Leukoc. Biol.*, 69(1), 129-137.
- Murali-Krishna, K., Altman, J. D., Suresh, M., Sourdive, D. J., Zajac, A. J., Miller, J. D., Slansky, J., and Ahmed, R. (1998). "Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection." *Immunity*, 8(2), 177-187.
- Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D. (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." *Nat. Med.*, 4(3), 328-332.
- Nielsen, M. B., Monsurro, V., Migueles, S. A., Wang, E., Perez-Diez, A., Lee, K. H., Kammula, U., Rosenberg, S. A., and Marincola, F. M. (2000). "Status of activation of circulating vaccine-elicited CD8+ T cells." *J. Immunol.*, 165(4), 2287-2296.
- Nociari, M. M., Telford, W., and Russo, C. (1999). "Postthymic development of CD28-CD8+ T cell subset: age-associated expansion and shift from memory to naive phenotype." *J. Immunol.*, 162(6), 3327-3335.
- Noppen, C., Schaefer, C., Zajac, P., Schutz, A., Kocher, T., Kloth, J., Heberer, M., Colonna, M., De Libero, G., and Spagnoli, G. C. (1998). "C-type lectin-like receptors in peptide-specific HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes: differential expression and modulation of effector functions in clones sharing identical TCR structure and epitope specificity." *Eur. J. Immunol.*, 28(4), 1134-1142.
- O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K., and Shanahan, F. (1999). "The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege." *Immunol. Today*, 20(1), 46-52.
- Openshaw, P., Murphy, E. E., Hosken, N. A., Maino, V., Davis, K., Murphy, K., and O'Garra, A. (1995). "Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations." *J. Exp. Med.*, 182(5), 1357-1367.

- Opferman, J. T., Ober, B. T., Narayanan, R., and Ashton-Rickardt, P. G. (2001). "Suicide induced by cytolytic activity controls the differentiation of memory CD8(+) T lymphocytes." *Int. Immunol.*, 13(4), 411-419.
- Oshima, H., Nakano, H., Nohara, C., Kobata, T., Nakajima, A., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Muto, T., Yagita, H., and Okumura, K. (1998). "Characterization of murine CD70 by molecular cloning and mAb." *Int. Immunol.*, 10(4), 517-526.
- Oughton, J. A. and Kerkvliet, N. I. (1999). "Novel phenotype associated with in vivo activated CTL precursors." *Clin. Immunol.*, 90(3), 323-333.
- Panelli, M. C., Riker, A., Kammula, U., Wang, E., Lee, K. H., Rosenberg, S. A., and Marincola, F. M. (2000). "Expansion of tumor-T cell pairs from fine needle aspirates of melanoma metastases." *J. Immunol.*, 164(1), 495-504.
- Pass, H. A., Schwarz, S. L., Wunderlich, J. R., and Rosenberg, S. A. (1998). "Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay." *Cancer J. Sci. Am.*, 4(5), 316-323.
- Pawelec, G., Adibzadeh, M., Solana, R., and Beckman, I. (1997). "The T cell in the ageing individual." *Mech. Ageing Dev.*, 93(1-3), 35-45.
- Pfreundschuh, M., Shiku, H., Takahashi, T., Ueda, R., Ransohoff, J., Oettgen, H. F., and Old, L. J. (1978). "Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75(10), 5122-5126.
- Picker, L. J., Singh, M. K., Zdraveski, Z., Treer, J. R., Waldrop, S. L., Bergstresser, P. R., and Maino, V. C. (1995). "Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry." *Blood*, 86(4), 1408-1419.
- Pittet, M.J., Zippelius, A., Valori, D., Speiser, D.E., Cerottini, J.C., Romero, P. (2002) "Melan-A/MART-1-specific CD8 T cells: from thymus to tumor." *Trends Immunol*, Jul;23(7):325-8
- Pittet, M. J., Valmori, D., Dunbar, P. R., Speiser, D. E., Lienard, D., Lejeune, F., Fleischhauer, K., Cerundolo, V., Cerottini, J. C., and Romero, P. (1999). "High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals." *J. Exp. Med.*, 190(5), 705-715.
- Pollok, K. E., Kim, Y. J., Zhou, Z., Hurtado, J., Kim, K. K., Pickard, R. T., and Kwon, B. S. (1993). "Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function." *J. Immunol.*, 150(3), 771-781.
- Pollok, K. E., Kim, Y. J., Hurtado, J., Zhou, Z., Kim, K. K., and Kwon, B. S. (1994). "4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti-mu-primed splenic B cells." *Eur. J. Immunol.*, 24(2), 367-374.
- Rabinowich, H., Reichert, T. E., Kashii, Y., Gastman, B. R., Bell, M. C., and Whiteside, T. L. (1998). "Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand- expressing ovarian carcinoma cells. Implications for altered expression of T cell receptor in tumor-associated lymphocytes." *J. Clin. Invest.*, 101(11), 2579-2588.
- Raulet, D. H., Vance, R. E., and McMahon, C. W. (2001). "Regulation of the natural killer cell receptor repertoire." *Annu. Rev. Immunol.*, 19, 291-330.
- Reichert, T. E., Rabinowich, H., Johnson, J. T., and Whiteside, T. L. (1998). "Mechanisms responsible for signaling and functional defects." *J. Immunother.*, 21(4), 295-306.
- Renner, C., Ohnesorge, S., Held, G., Bauer, S., Jung, W., Pfitzenmeier, J. P., and Pfreundschuh, M. (1996). "T cells from patients with Hodgkin's disease have a defective T-cell receptor zeta

- chain expression that is reversible by T-cell stimulation with CD3 and CD28." *Blood*, 88(1), 236-241.
- Restifo, N. P., Marincola, F. M., Kawakami, Y., Taubenberger, J., Yannelli, J. R., and Rosenberg, S. A. (1996). "Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy." *J. Natl. Cancer Inst.*, 88(2), 100-108.
- Reynolds, S. R., Celis, E., Sette, A., Oratz, R., Shapiro, R. L., Johnston, D., Fotino, M., and Bystry, J. C. (1998). "HLA-independent heterogeneity of CD8+ T cell responses to MAGE-3, Melan-A/MART-1, gp100, tyrosinase, MC1R, and TRP-2 in vaccine-treated melanoma patients." *J. Immunol.*, 161(12), 6970-6976.
- Ridge, J. P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." *Nature*, 393(6684), 474-478.
- Rivoltini, L., Loftus, D. J., Barracchini, K., Arienti, F., Mazzocchi, A., Biddison, W. E., Salgaller, M. L., Appella, E., Parmiani, G., and Marincola, F. M. (1996). "Binding and presentation of peptides derived from melanoma antigens MART-1 and glycoprotein-100 by HLA-A2 subtypes. Implications for peptide-based immunotherapy." *J. Immunol.*, 156(10), 3882-3891.
- Rivoltini, L., Radrizzani, M., Accornero, P., Squarcina, P., Chiodoni, C., Mazzocchi, A., Castelli, C., Tarsini, P., Viggiano, V., Belli, F., Colombo, M. P., and Parmiani, G. (1998). "Human melanoma-reactive CD4+ and CD8+ CTL clones resist Fas ligand-induced apoptosis and use Fas/Fas ligand-independent mechanisms for tumor killing." *J. Immunol.*, 161(3), 1220-1230.
- Rivoltini, L., Loftus, D. J., Squarcina, P., Castelli, C., Rini, F., Arienti, F., Belli, F., Marincola, F. M., Geisler, C., Borsatti, A., Appella, E., and Parmiani, G. (1998). "Recognition of melanoma-derived antigens by CTL: possible mechanisms involved in down-regulating anti-tumor T-cell reactivity." *Crit Rev. Immunol.*, 18(1-2), 55-63.
- Rivoltini, L., Squarcina, P., Loftus, D. J., Castelli, C., Tarsini, P., Mazzocchi, A., Rini, F., Viggiano, V., Belli, F., and Parmiani, G. (1999). "A superagonist variant of peptide MART1/Melan A27-35 elicits anti-melanoma CD8+ T cells with enhanced functional characteristics: implication for more effective immunotherapy." *Cancer Res.*, 59(2), 301-306.
- Robbins, P. F., el Gamil, M., Kawakami, Y., Stevens, E., Yannelli, J. R., and Rosenberg, S. A. (1994). "Recognition of tyrosinase by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient responding to immunotherapy." *Cancer Res.*, 54(12), 3124-3126.
- Robbins, P. F., el Gamil, M., Li, Y. F., Topalian, S. L., Rivoltini, L., Sakaguchi, K., Appella, E., Kawakami, Y., and Rosenberg, S. A. (1995). "Cloning of a new gene encoding an antigen recognized by melanoma-specific HLA-A24-restricted tumor-infiltrating lymphocytes." *J. Immunol.*, 154(11), 5944-5950.
- Robbins, P. F., el Gamil, M., Li, Y. F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., and Rosenberg, S. A. (1996). "A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes." *J. Exp. Med.*, 183(3), 1185-1192.
- Romero, P., Dunbar, P. R., Valmori, D., Pittet, M., Ogg, G. S., Rimoldi, D., Chen, J. L., Lienard, D., Cerottini, J. C., and Cerundolo, V. (1998). "Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes." *J. Exp. Med.*, 188(9), 1641-1650.
- Rosenberg, S. A. (1990). "Adoptive immunotherapy for cancer." *Sci. Am.*, 262(5), 62-69.
- Rosenberg, S. A., Yannelli, J. R., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Weber, J. S., Parkinson, D. R., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., and White, D. E. (1994). "Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2." *J. Natl. Cancer Inst.*, 86(15), 1159-1166.

- Rosenberg, S. A. and White, D. E. (1996). "Vitiligo in patients with melanoma: normal tissue antigens can be targets for cancer immunotherapy." *J. Immunother. Emphasis. Tumor Immunol.*, 19(1), 81-84.
- Rosenberg, S. A. (1997). "Keynote address: perspectives on the use of interleukin-2 in cancer treatment." *Cancer J. Sci. Am.*, 3 Suppl 1, S2-S6.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., White, D. E., and Steinberg, S. M. (1998). "Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response." *Ann. Surg.*, 228(3), 307-319.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Dudley, M. E., Schwarz, S. L., Spiess, P. J., Wunderlich, J. R., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., and White, D. E. (1998). "Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma." *Nat. Med.*, 4(3), 321-327.
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1997). "Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene." *Cancer Res.*, 57(20), 4624-4630.
- Sahin, U., Koslowski, M., Tureci, O., Eberle, T., Zwick, C., Romeike, B., Moringlane, J. R., Schwechheimer, K., Feiden, W., and Pfreundschuh, M. (2000). "Expression of cancer testis genes in human brain tumors." *Clin. Cancer Res.*, 6(10), 3916-3922.
- Salgaller, M. L., Marincola, F. M., Cormier, J. N., and Rosenberg, S. A. (1996). "Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides." *Cancer Res.*, 56(20), 4749-4757.
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2000). "Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression." *Immunol. Rev.*, 177, 134-140.
- Salomon, B. and Bluestone, J. A. (2001). "Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation." *Annu. Rev. Immunol.*, 19, 225-252.
- Scheibenbogen, C., Nagorsen, D., Seliger, B., Schmittel, A., Letsch, A., Bauer, S., Max, N., Bock, M., Atkins, D., Thiel, E., and Keilholz, U. (2002). "Long-term freedom from recurrence in 2 stage IV melanoma patients following vaccination with tyrosinase peptides." *Int. J. Cancer*, 99(3), 403-408.
- Scheibenbogen, C., Sun, Y., Keilholz, U., Song, M., Stevanovic, S., Asemissen, A. M., Nagorsen, D., Thiel, E., Rammensee, H. G., and Schadendorf, D. (2002). "Identification of known and novel immunogenic T-cell epitopes from tumor antigens recognized by peripheral blood T cells from patients responding to IL-2-based treatment." *Int. J. Cancer*, 98(3), 409-414.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., and Melief, C. J. (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." *Nature*, 393(6684), 480-483.
- Schuler, G. and Steinman, R. M. (1997). "Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors." *J. Exp. Med.*, 186(8), 1183-1187.
- Schultz-Thater, E., Juretic, A., Dellabona, P., Luscher, U., Siegrist, W., Harder, F., Heberer, M., Zuber, M., and Spagnoli, G. C. (1994). "MAGE-1 gene product is a cytoplasmic protein." *Int. J. Cancer*, 59(3), 435-439.
- Schultze, J., Nadler, L. M., and Gribben, J. G. (1996). "B7-mediated costimulation and the immune response." *Blood Rev.*, 10(2), 111-127.

- Schwartz, R. H. (1992). "Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy." *Cell*, 71(7), 1065-1068.
- Seder, R. A., Gazzinelli, R., Sher, A., and Paul, W. E. (1993). "Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(21), 10188-10192.
- Shinde, S., Wu, Y., Guo, Y., Niu, Q., Xu, J., Grewal, I. S., Flavell, R., and Liu, Y. (1996). "CD40L is important for induction of, but not response to, costimulatory activity. ICAM-1 as the second costimulatory molecule rapidly up-regulated by CD40L." *J. Immunol.*, 157(7), 2764-2768.
- Skipper, J. C., Kittlesen, D. J., Hendrickson, R. C., Deacon, D. D., Harthun, N. L., Wagner, S. N., Hunt, D. F., Engelhard, V. H., and Slingluff, C. L., Jr. (1996). "Shared epitopes for HLA-A3-restricted melanoma-reactive human CTL include a naturally processed epitope from Pmel-17/gp100." *J. Immunol.*, 157(11), 5027-5033.
- Slavik, J. M., Hutchcroft, J. E., and Bierer, B. E. (1999). "CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function." *Immunol. Res.*, 19(1), 1-24.
- Smyth, M. J. and Godfrey, D. I. (2000). "NKT cells and tumor immunity--a double-edged sword." *Nat. Immunol.*, 1(6), 459-460.
- Soloski, M. J. (2001). "Recognition of tumor cells by the innate immune system." *Curr. Opin. Immunol.*, 13(2), 154-162.
- Spagnoli, G. C., Schaefer, C., Willmann, T. E., Kocher, T., Amoroso, A., Juretic, A., Zuber, M., Luscher, U., Harder, F., and Heberer, M. (1995). "Peptide-specific CTL in tumor infiltrating lymphocytes from metastatic melanomas expressing MART-1/Melan-A, gp100 and Tyrosinase genes: a study in an unselected group of HLA-A2.1-positive patients." *Int. J. Cancer*, 64(5), 309-315.
- Speiser, D. E., Pittet, M. J., Valmori, D., Dunbar, R., Rimoldi, D., Lienard, D., MacDonald, H. R., Cerottini, J. C., Cerundolo, V., and Romero, P. (1999). "In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes." *J. Exp. Med.*, 190(6), 775-782.
- Speiser, D. E., Valmori, D., Rimoldi, D., Pittet, M. J., Lienard, D., Cerundolo, V., MacDonald, H. R., Cerottini, J. C., and Romero, P. (1999). "CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients." *Eur. J. Immunol.*, 29(6), 1990-1999.
- Staveley-O'Carroll, K., Sotomayor, E., Montgomery, J., Borrello, I., Hwang, L., Fein, S., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1998). "Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(3), 1178-1183.
- Stuhler, G. and Walden, P. (1993). "Collaboration of helper and cytotoxic T lymphocytes." *Eur. J. Immunol.*, 23(9), 2279-2286.
- Stuhler, G. and Walden, P. (1994). "Recruitment of helper T cells for induction of tumour rejection by cytolytic T lymphocytes." *Cancer Immunol. Immunother.*, 39(5), 342-345.
- Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T. J., and Eisen, H. N. (1996). "Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response." *Immunity.*, 4(6), 565-571.
- Tartour, E., Latour, S., Mathiot, C., Thiounn, N., Mosseri, V., Joyeux, I., D'Enghien, C. D., Lee, R., Debre, B., and Fridman, W. H. (1995). "Variable expression of CD3-zeta chain in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) derived from renal-cell carcinoma: relationship with TIL phenotype and function." *Int. J. Cancer*, 63(2), 205-212.

- Taylor, D. D., Bender, D. P., Gercel-Taylor, C., Stanson, J., and Whiteside, T. L. (2001). "Modulation of TcR/CD3-zeta chain expression by a circulating factor derived from ovarian cancer patients." *Br. J. Cancer*, 84(12), 1624-1629.
- Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D. D., Carbone, D. P., Paul, W. E., and Berzofsky, J. A. (2000). "NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway." *Nat. Immunol.*, 1(6), 515-520.
- Thomas, W. D. and Hersey, P. (1998). "CD4 T cells kill melanoma cells by mechanisms that are independent of Fas (CD95)." *Int. J. Cancer*, 75(3), 384-390.
- Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den, D. P., Bocker, E. B., Steinman, R. M., Enk, A., Kampgen, E., and Schuler, G. (1999). "Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma." *J. Exp. Med.*, 190(11), 1669-1678.
- Tomita, Y., Kimura, M., Tanikawa, T., Nishiyama, T., Morishita, H., Takeda, M., Fujiwara, M., and Sato, S. (1993). "Immunohistochemical detection of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and major histocompatibility complex class I antigens in seminoma." *J. Urol.*, 149(3), 659-663.
- Topalian, S. L., Solomon, D., and Rosenberg, S. A. (1989). "Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas." *J. Immunol.*, 142(10), 3714-3725.
- Topalian, S. L., Rivoltini, L., Mancini, M., Markus, N. R., Robbins, P. F., Kawakami, Y., and Rosenberg, S. A. (1994). "Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91(20), 9461-9465.
- Traversari, C., van der, B. P., Luescher, I. F., Lurquin, C., Chomez, P., Van Pel, A., De Plaen, E., Amar-Costesec, A., and Boon, T. (1992). "A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E." *J. Exp. Med.*, 176(5), 1453-1457.
- Trefzer, U., Weingart, G., Chen, Y., Herberth, G., Adrian, K., Winter, H., Audring, H., Guo, Y., Sterry, W., and Walden, P. (2000). "Hybrid cell vaccination for cancer immune therapy: first clinical trial with metastatic melanoma." *Int. J. Cancer*, 85(5), 618-626.
- Tsai, V., Southwood, S., Sidney, J., Sakaguchi, K., Kawakami, Y., Appella, E., Sette, A., and Celis, E. (1997). "Identification of subdominant CTL epitopes of the GP100 melanoma-associated tumor antigen by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells." *J. Immunol.*, 158(4), 1796-1802.
- Tureci, O., Sahin, U., Schobert, I., Koslowski, M., Scmitt, H., Schild, H. J., Stenner, F., Seitz, G., Rammensee, H. G., and Pfreundschuh, M. (1996). "The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40." *Cancer Res.*, 56(20), 4766-4772.
- Valmori, D., Gervois, N., Rimoldi, D., Fonteneau, J. F., Bonelo, A., Lienard, D., Rivoltini, L., Jotereau, F., Cerottini, J. C., and Romero, P. (1998). "Diversity of the fine specificity displayed by HLA-A*0201-restricted CTL specific for the immunodominant Melan-A/MART-1 antigenic peptide." *J. Immunol.*, 161(12), 6956-6962.
- Valmori, D., Fonteneau, J. F., Lizana, C. M., Gervois, N., Lienard, D., Rimoldi, D., Jongeneel, V., Jotereau, F., Cerottini, J. C., and Romero, P. (1998). "Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues." *J. Immunol.*, 160(4), 1750-1758.

- Valmori, D., Scheibenbogen, C., Dutoit, V., Nagorsen, D., Asemissen, A. M., Rubio-Godoy, V., Rimoldi, D., Guillaume, P., Romero, P., Schadendorf, D., Lipp, M., Dietrich, P. Y., Thiel, E., Cerottini, J. C., Lienard, D., and Keilholz, U. (2002). "Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity." *Cancer Res.*, 62(6), 1743-1750.
- Van den Eynde, B. J. and van der, B. P. (1997). "T cell defined tumor antigens." *Curr. Opin. Immunol.*, 9(5), 684-693.
- van Elsas, A., van der Burg, S. H., van der Minne, C. E., Borghi, M., Mourer, J. S., Melief, C. J., and Schrier, P. I. (1996). "Peptide-pulsed dendritic cells induce tumoricidal cytotoxic T lymphocytes from healthy donors against stably HLA-A*0201-binding peptides from the Melan-A/MART-1 self antigen." *Eur. J. Immunol.*, 26(8), 1683-1689.
- Van Pel, A., van der, B. P., Coulie, P. G., Brichard, V. G., Lethe, B., van den, E. B., Uyttenhove, C., Renauld, J. C., and Boon, T. (1995). "Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes." *Immunol. Rev.*, 145, 229-250.
- Verret, C. R., Firmenich, A. A., Kranz, D. M., and Eisen, H. N. (1987). "Resistance of cytotoxic T lymphocytes to the lytic effects of their toxic granules." *J. Exp. Med.*, 166(5), 1536-1547.
- Vingerhoets, J. H., Vanham, G. L., Kestens, L. L., Penne, G. G., Colebunders, R. L., Vandenbruaene, M. J., Goeman, J., Gigase, P. L., De Boer, M., and Ceuppens, J. L. (1995). "Increased cytolytic T lymphocyte activity and decreased B7 responsiveness are associated with CD28 down-regulation on CD8+ T cells from HIV-infected subjects." *Clin. Exp. Immunol.*, 100(3), 425-433.
- Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., and Lanzavecchia, A. (1999). "T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains." *Science*, 283(5402), 680-682.
- Visseren, M. J., van Elsas, A., van der Voort, E. I., Rensing, M. E., Kast, W. M., Schrier, P. I., and Melief, C. J. (1995). "CTL specific for the tyrosinase autoantigen can be induced from healthy donor blood to lyse melanoma cells." *J. Immunol.*, 154(8), 3991-3998.
- Waldrop, S. L., Davis, K. A., Maino, V. C., and Picker, L. J. (1998). "Normal human CD4+ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis." *J. Immunol.*, 161(10), 5284-5295.
- Walker, C., Robertson, L., Myskow, M., and Dixon, G. (1995). "Expression of the BCL-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas." *Br. J. Cancer*, 72(1), 164-169.
- Walunas, T. L. and Bluestone, J. A. (1998). "CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo." *J. Immunol.*, 160(8), 3855-3860.
- Wang, E., Phan, G. Q., and Marincola, F. M. (2001). "T-cell-directed cancer vaccines: the melanoma model." *Expert. Opin. Biol. Ther.*, 1(2), 277-290.
- Wang, E. C., Lehner, P. J., Graham, S., and Borysiewicz, L. K. (1994). "CD8high (CD57+) T cells in normal, healthy individuals specifically suppress the generation of cytotoxic T lymphocytes to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines." *Eur. J. Immunol.*, 24(11), 2903-2909.
- Wang, F., Bade, E., Kuniyoshi, C., Spears, L., Jeffery, G., Marty, V., Groshen, S., and Weber, J. (1999). "Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma." *Clin. Cancer Res.*, 5(10), 2756-2765.
- Wang, R. F., Johnston, S. L., Zeng, G., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., and Rosenberg, S. A. (1998). "A breast and melanoma-shared tumor antigen: T cell responses to antigenic peptides translated from different open reading frames." *J. Immunol.*, 161(7), 3598-3606.

- Watts, T. H. and DeBenedette, M. A. (1999). "T cell co-stimulatory molecules other than CD28." *Curr. Opin. Immunol.*, 11(3), 286-293.
- Weber, J., Salgaller, M., Samid, D., Johnson, B., Herlyn, M., Lassam, N., Treisman, J., and Rosenberg, S. A. (1994). "Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine." *Cancer Res.*, 54(7), 1766-1771.
- Weynants, P., Lethe, B., Brasseur, F., Marchand, M., and Boon, T. (1994). "Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas." *Int. J. Cancer*, 56(6), 826-829.
- Whiteman, D. C., Whiteman, C. A., and Green, A. C. (2001). "Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies." *Cancer Causes Control*, 12(1), 69-82.
- Whiteside, T. L. and Parmiani, G. (1994). "Tumor-infiltrating lymphocytes: their phenotype, functions and clinical use." *Cancer Immunol. Immunother.*, 39(1), 15-21.
- Wolfel, T., Schneider, J., Meyer Zum Buschenfelde, K. H., Rammensee, H. G., Rotzschke, O., and Falk, K. (1994). "Isolation of naturally processed peptides recognized by cytolytic T lymphocytes (CTL) on human melanoma cells in association with HLA-A2.1." *Int. J. Cancer*, 57(3), 413-418.
- Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer Zum Buschenfelde, K. H., and Beach, D. (1995). "A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma." *Science*, 269(5228), 1281-1284.
- Wu, R. S., Kobie, J. J., Besselsen, D. G., Fong, T. C., Mack, V. D., McEarchern, J. A., and Akporiaye, E. T. (2001). "Comparative analysis of IFN-gamma B7.1 and antisense TGF-beta gene transfer on the tumorigenicity of a poorly immunogenic metastatic mammary carcinoma." *Cancer Immunol. Immunother.*, 50(5), 229-240.
- Yamashita, N., Ishibashi, H., Hayashida, K., Kudo, J., Takenaka, K., Itoh, K., and Niho, Y. (1996). "High frequency of the MAGE-1 gene expression in hepatocellular carcinoma." *Hepatology*, 24(6), 1437-1440.
- Yanagida, T., Kato, T., Igarashi, O., Inoue, T., and Nariuchi, H. (1994). "Second signal activity of IL-12 on the proliferation and IL-2R expression of T helper cell-1 clone." *J. Immunol.*, 152(10), 4919-4928.
- Yee, C., Thompson, J. A., Roche, P., Byrd, D. R., Lee, P. P., Piepkorn, M., Kenyon, K., Davis, M. M., Riddell, S. R., and Greenberg, P. D. (2000). "Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo." *J. Exp. Med.*, 192(11), 1637-1644.
- Yssel, H., Fasler, S., Aversa, G., and de Vries, J. E. (1996). "Peptide induced anergy of human allergen-specific T cells." *Adv. Exp. Med. Biol.*, 409, 405-410.
- Yue, F. Y., Dummer, R., Geertsens, R., Hofbauer, G., Laine, E., Manolio, S., and Burg, G. (1997). "Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules." *Int. J. Cancer*, 71(4), 630-637.

Anhang

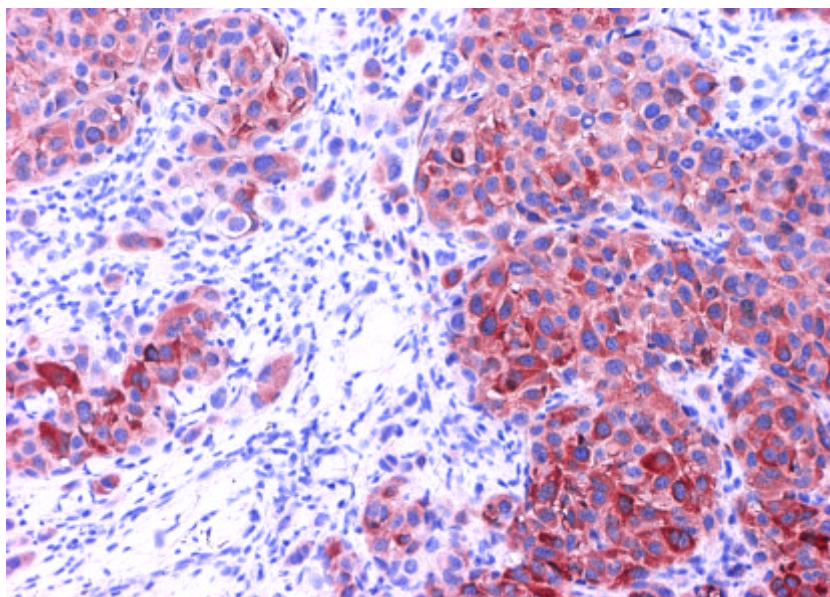


Abbildung 1: Immunhistologische Färbung mit anti-MelanA AK einer Metastase von Patient MDU (10x)

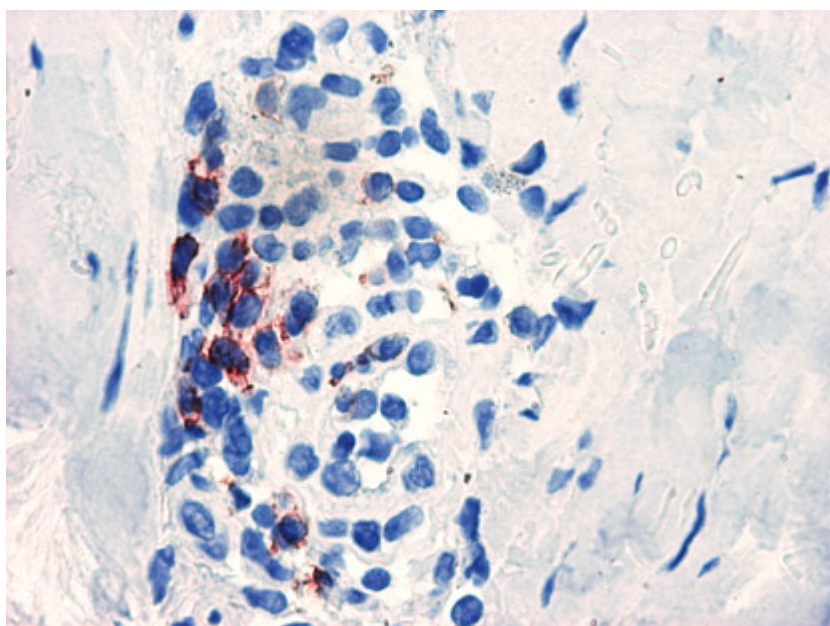


Abbildung 2: Immunhistologische Färbung des CD4-Infiltrates in der Injektionsstelle der Peptid-Vakzine bei Patient HIG, 40x

Lebenslauf

Gunda Herberth, geboren am 22.03.1968 in Ploiesti/Rumänien, als Tochter von Johanna und Johann Herberth.

1975 – 1979	Grundschule in Baaßen/Rumänien
1979 – 1983	Gesamtschule in Ploiesti/Rumänien
1983 – 1987	Gymnasium in Ploiesti/Rumänien, Abschluss: Abitur
September 1987	Aussiedlung in die BRD
1988 – 1989	Einjähriger Sonderlehrgang für deutsche Aussiedler am Droste-Hülshoff Gymnasium in Meersburg/Baden-Württemberg mit Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife, Abitur
1990 – 1992	Biologiestudium an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Vordiplom
1992 – 1996	Biologiestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1993	Auslandsstudium an den Universitäten Turku und Oulu in Finnland
März 1995	Mündliche Diplomprüfungen
1995 – 1996	Diplomarbeit am Hygieneinstitut der Universität Tübingen. Thema: „Katalase, Myeloperoxidase und Wasserstoffperoxid bei Mukoviszidose“.
1996 – 1997	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an einem Projekt der Karl und Veronica Carstens Stiftung im Virchow-Klinikum, Berlin. Thema: „Die Auswirkung von Zytokinen auf die Sauerstoffradikalbildung von Zellen“
1997 – 2001	Anfertigung der vorliegenden Dissertation, praktische Arbeit, in der Abteilung Dermatologie des Universitätsklinikums Charité Berlin, im Rahmen der Forschergruppe „Tumoren der Haut“. Thema: „Analyse der Tumor-spezifischen T-Zellen bei Melanompatienten unter Immuntherapie“.
04/01 – 08/01	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Deutschen Rheumaforschungszentrum, Berlin, in der Arbeitsgruppe Dr. Riemekasten/Prof. Hiepe, Thema: Charakterisierung von autoantigen-spezifischen T-Zellen beim SLE durch das pathogenetisch bedeutsame SmD ₁₈₃₋₁₁₉ Peptid
09/01 – zur Zeit	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Zellbiologie der Firma metaGen Pharmaceuticals GmbH